



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Química Biológica**

**Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas
Prof. Dr. "Alejandro C. Paladini"**

Influencia del entorno lipídico sobre la actividad biológica de la bomba de calcio de membrana plasmática

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Bioq. María Florencia Pignataro

Director: Dr. Juan Pablo Rossi

Directora adjunta: Dra. Irene Mangialavori

2017

Agradecimientos

Al Dr. Jean Paul Rossi, mi director de tesis. A la Dra. Irene Mangialavori, mi directora adjunta. Al Dr. José María Delfino con quien tuve el privilegio de colaborar.

Al Dr. Luis González Flecha y al Dr. Rolando Rossi.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto y el Departamento de Química Biológica. Mención especial al Dr. Martín Dodes, con quien trabajamos en colaboración.

A mis compas del laboratorio de JP: Marie, Marian, Cande, Jorginius, Nico, Mallku, Deby y Mari.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, la Universidad de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

A mis amigos de la facu y de la vida.

A toda la familia, los Pignataro y los Rizo.

A mis abuelos, Gregorio, Dominga y Josefina.

A Moni, la tía Haydee y la tía Filo.

A mis viejos, Anita y Mingo. A mi hermano Diego.

A mi sobrino Francisco, por cambiarnos la vida.

A Nico, mi compañero.

Presentaciones

Los resultados de la presente tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente trabajo científico:

- **“Modulation of Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase by neutral Phospholipids”.**
María F. Pignataro, Martín M. Dodes- Traian, F. Luis González Flecha, Mauricio Sica, Irene C. Mangialavori, y Juan Pablo F. C. *J. Biol. Chem.* 2015. March 6; 290(10): 6179-90. doi: 10.1074/jbc.M114.585828. Epub 2015 Jan 20.

Durante mi formación he colaborado en los siguientes trabajos:

- **“Plasma membrane calcium pump (PMCA) differential exposure of hydrophobic domains after calmodulin and phosphatidic acid activation”.**
Mangialavori I, Villamil-Giraldo AM, Pignataro MF, Ferreira-Gomes M, Caride AJ, Rossi JP. *J Biol Chem.* 2011 May 27;286(21):18397-404. doi: 10.1074/jbc.M110.210088. Epub 2011 Mar 31.
- **“Determination of the dissociation constants for Ca^{2+} and calmodulin from the plasma membrane Ca^{2+} pump by a lipid probe that senses membrane domain changes”.** Mangialavori I, Ferreira-Gomes M, Pignataro MF, Strehler EE, Rossi JP. *J Biol Chem.* 2010 Jan 1; 285(1):123-30. doi: 10.1074/jbc.M109.076679. Epub 2009 Nov 5

Los resultados publicados en esta tesis han obtenido la siguiente distinción:

- **Premio “Agustín Marenzi”.** Año 2013. Área de Química Biológica. Otorgado por La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica por el trabajo denominado: “Influencia del entorno lipídico sobre la actividad biológica de las proteínas integrales de membrana” Autores: María Florencia Pignataro, Martín M. Dodes Traian, F. Luis Gonzáles Flecha e Irene Mangialavori

Resumen

Las proteínas de membrana son esenciales para la regulación de la composición del medio celular, el potencial de membrana, el metabolismo y las vías de señalización. Por su ubicación son consideradas la puerta de ingreso a la célula y el blanco de muchas drogas, ya que más de la mitad de las moléculas terapéuticas pequeñas están dirigidas contra proteínas asociadas a la membrana. Sin embargo, existen escasas estructuras tridimensionales de dichas proteínas debido a las dificultades inherentes a su expresión, extracción, purificación y a la obtención de muestras abundantes y homogéneas que permitan su estudio cristalográfico. Dada su relevancia fisiopatológica y farmacológica, ha sido de especial interés desarrollar diferentes estrategias con el fin de obtener la información necesaria para resolver los distintos aspectos del complejo entramado entorno-estructura-función.

La bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA) pertenece a la superfamilia de las P-ATPasas; está presente en la membrana plasmática de todas las células eucariotas y es uno de los sistemas que participa en la remoción del Ca^{2+} citosólico transportándolo hacia el medio extracelular. A diferencia de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (NCKX), que también remueven el Ca^{2+} citosólico, la PMCA es un sistema de alta afinidad y baja capacidad de transporte de Ca^{2+} . La PMCA es regulada por calmodulina, fosfolípidos ácidos y ácidos grasos insaturados. Además, los fosfolípidos neutros como la fosfatidilcolina son esenciales para la actividad de la enzima.

En el presente trabajo de Tesis, estudiamos la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la fracción molar de fosfolípidos. Para tal fin, reconstituimos a la PMCA en micelas mixtas con diferentes proporciones de detergente/fosfatidilcolina y a su vez, diferentes largos de cadenas carbonadas de fosfatidilcolina. Los sistemas micelares mixtos se han utilizado ampliamente para el estudio de la interacción de las proteínas integrales de membrana con su entorno hidrofóbico. En particular, se ha aceptado el uso de este tipo de sistemas para el estudio de la PMCA ya que la misma

preserva las características bioquímicas presentes en su entorno nativo. Hemos caracterizado la transición micela-vesícula de los diferentes sistemas de reconstitución utilizando para tal fin dos técnicas diferentes, la dispersión de luz estática (SLS) y la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS). Además determinamos los niveles de intermediarios fosforilados de la PMCA que permitieron describir funcionalmente los efectos ejercidos no sólo por la fracción molar presente en la micela mixta sino también la acción de diferentes largos de cadena carbonada. Finalmente, realizamos simulaciones de dinámica molecular de un modelo de la PMCA insertado en bicapas de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) de manera de explorar el efecto del grosor hidrofóbico del dominio transmembrana de la PMCA sobre la actividad ATPasa.

Mediante estas estrategias experimentales demostramos que los fosfolípidos neutros modulan la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, modificando el número de recambio de la enzima en función de la composición de la micela mixta y de las características de las moléculas de fosfatidilcolina. Los cambios biofísicos asociados con la transición micela-vesícula incrementan el tiempo de permanencia de la enzima en el intermediario fosforilado, siendo este paso el responsable de la disminución de la actividad enzimática. Las simulaciones de dinámica molecular permitieron demostrar que cuando la PMCA se encuentra inserta en bicapas de DOPC, existen residuos cargados incluidos en el centro hidrofóbico de dichas bicapas. De manera complementaria, en las bicapas de DMPC los requerimientos de la superficie proteica se satisfacen evitando el costo termodinámico de exponer residuos cargados en zonas hidrofóbicas. De acuerdo a los datos experimentales, sugerimos que el grosor hidrofóbico óptimo para la PMCA es cercano a 24 Å, en concordancia con la máxima actividad hallada en presencia de este fosfolípido de 14 átomos de carbono de su cadena hidrofóbica.

Para estudiar la modulación de la PMCA por ácidos grasos insaturados, se desarrolló un análogo fotoactivable de ácido oleico (AS86). Esta molécula se une covalentemente a la PMCA y es desplazable por ácido oleico. En la presente tesis hemos sintetizado, purificado y caracterizado dicho análogo y comprobamos que el AS86 se comporta de manera análoga al ácido oleico, cuando interactúa mediante

unión no-covalente, incrementando la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en el rango de concentraciones en las que actúa el ácido oleico. En este mismo sentido, pudimos demostrar que el AS86 es capaz de interactuar directamente con PMCA e inducir un cambio conformacional tal que sus segmentos transmembrana se encuentran menos expuestos al entorno lipídico. Esta última característica es compartida por todos los activadores de la PMCA estudiados, incluyendo el ácido oleico. Estas evidencias demuestran la gran similitud entre la sonda fotoactivable AS86 y el ácido oleico. A partir de allí, desarrollamos una estrategia experimental que involucra la fotomarcación de la PMCA con AS86 y un posterior análisis por espectrometría de masa de los fragmentos para hallar los posibles sitios de interacción de la enzima con los ácidos grasos insaturados. La estrategia adoptada se basó en unir covalentemente el AS86 a la PMCA, realizar la digestión del aducto con V8 proteasa, separar por SDS-PAGE los fragmentos y posteriormente digerir *in-gel* con tripsina y luego analizar los péptidos resultantes por espectrometría de masa. Los resultados aquí mostrados constituyen la primera evidencia de un análisis mediante MALDI TOF-TOF de fragmentos tripticos de la PMCA purificada de eritrocitos humanos. Proponemos una región para la interacción del AS86 con la PMCA (**E₈₁₂ASDIILTDDNFTSIVKAVMW₈₃₂**) que podría ser parte de un dominio donde interactúan varias moléculas de ácidos grasos para el transporte de calcio.

En conclusión, en el presente trabajo hemos estudiado la regulación del transporte de calcio por fosfolípidos neutros y por ácidos grasos insaturados mediante el desarrollo de diferentes estrategias experimentales. Además hemos modelado la acción de estos lípidos sobre la estructura y la función de la PMCA.

Abreviaturas

ADP	Adenosina 5`difosfato
AGI	Ácidos grasos insaturados
AO	Ácido oleico
AS86	Ácido 8-(o-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico
ATP	Adenosina 5`trifosfato
ATPasa	Adenosina 5`trifosfatasa
C ₁₂ E ₁₀	Polioxietileno 10-lauril éter
CaM	Calmodulina
cpm	Cuentas por minuto
(di14:1)PC	1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
(di16:1)PC	1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DLPC	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DTT	1,4-ditiotrietol
EGTA	ácido etilenglicol bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra acético
EM	Espectrometría de masas
ESR	Resonancia de spin electrónico
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
MOPS	ácido 3-(N-morfolin)-propanosulfónico
NA	Número de agregación
Na,K-ATPasa	Bomba de Sodio-Potasio
PDB	Protein Data Bank

Abreviaturas

PC	Fosfatidilcolina
Pi	Anión fosfato
PMCA	Bomba de Calcio de Membrana Plasmática
PSA	Persulfato amónico
Rho-DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lisamina rhodamina B sulfonil)
SAB	Seroalbumina bovina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SERCA	Bomba de Calcio de Retículo (sarco)endoplásmico
TCA	Ácido tricloro acético
t(<i>EP</i>)	Tiempo de residencia de la PMCA en el intermediario fosforilado
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
[¹²⁵ I] TID-PC/16	[¹²⁵ I] TID (3-(triflurometil)-3-(m-[¹²⁵ I] iodofenil) diazirina)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

A continuación se presenta el código de aminoácidos:

Aminoácido	Nombre abreviado	Símbolo
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tirosina	Tyr	Y
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E

ÍNDICE

PARTE I: INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Sistemas para el estudio de proteínas integrales de membrana.

Interacción lípido-proteína	2
1.1. Proteínas integrales de membrana: ¿Por qué estudiarlas?	2
1.2. Estrategias y herramientas para el estudio diferencial de las proteínas integrales de membrana	3
1.2.1. Biomembranas	3
1.2.2. Sistemas de reconstitución para el estudio de proteínas de membrana	4
1.2.2.1. Fragmentos de membranas celulares	5
1.2.2.2. Proteoliposomas	5
1.2.2.3. Micelas	6
1.2.2.3.1. Formación de micelas	6
1.2.2.3.2. Formas y tamaños de las micelas	7
1.2.2.3.3. Micelas mixtas	9
1.2.2.3.4. Sistemas fosfolípido-detergente	10
1.2.2.3.4.1. Modelo de tres estados	10
1.2.2.3.4.2. Sistemas fosfolípido-detergente-proteína	11
1.2.3. Sondas fotoactivables para el estudio de proteínas de membrana y biomembranas	12
1.2.3.1. Generalidades	12
1.2.3.2. Grupos fotoactivables de interés: Azidas, diazirinas y diazo compuestos	14
1.2.3.3. Métodos de detección y análisis de los aductos de fotomarcación: Ventajas y limitaciones	17
1.3. Interacción lípido-proteína	20
1.3.1. Tipos de interacción lípido-proteína	20
1.3.2. Ajuste hidrofóbico y presión lateral	21

Capítulo 2 La Bomba de Calcio de Membrana Plasmática: Su función y regulación

2.1. El Ca^{2+} intracelular: Funciones generales y regulación	24
2.2. La Bomba de Calcio de Membrana Plasmática (PMCA)	25
2.2.1. El ciclo de reacción	25
2.2.2. Estructura	27
2.2.3. Isoformas y variantes de empalme alternativo de la PMCA	29
2.2.4. Regulación de la actividad de las PMCA	32
2.2.4.1. Mecanismos que aumentan la actividad de las PMCA	32
2.2.4.2. Activación por calmodulina	32
2.2.4.3. Activación por fosfolípidos ácidos	32
2.2.4.4. Activación por ácidos grasos insaturados	34
2.2.4.5. Activación por fosforilación	35
2.2.4.6. Activación por proteólisis	36
2.2.4.7. Activación por dimerización/oligomerización	36
2.2.4.8. Mecanismos que inhiben la actividad de la PMCA	37
2.2.4.9. Inhibidores fisiológicos de la PMCA	38

2.2.5. Patologías relacionadas con defectos de las PMCA	39
Capítulo 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
PARTE II: METODOLOGÍAS	
Capítulo 4: Metodologías	48
4.1 Obtención de PMCA purificada	48
4.1.1. Aislamiento de membranas plasmáticas de eritrocitos humanos	48
4.1.2. Purificación de la PMCA a partir de membranas aisladas de eritrocitos Humanos	48
4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	50
4.3. Formación de micelas mixtas detergente-fosfolípidos	52
4.3.1. Cuantificación de fosfolípidos	52
4.4. Determinación de la concentración de Ca^{2+}	52
4.5. Determinación de la actividad Ca^{2+}-ATPasa de la PMCA purificada	53
4.5.1. Medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de fosfatidilcolina	53
4.5.2. Medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de concentraciones crecientes de AS86 y ácido oleico	53
4.5.3. Método colorimétrico por punto final	54
4.5.4. Método radiactivo	54
4.6. Determinación de los niveles de intermediarios fosforilados (EP) de la PMCA	55
4.7. Caracterización de la transición micela-vesícula	56
4.7.1. Dispersión de luz (SLS)	56
4.7.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)	56
4.8. Simulaciones computacionales de dinámica molecular	58
4.9. Síntesis de un análogo fotoactivable del ácido oleico: ácido 8-(o-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico (AS86)	59
4.9.1. Síntesis del ácido 5-azido salicílico	59
4.9.2. Síntesis del precursor ácido 8-(5'-Azidosalicilamido) octanoico (AS8) a partir del ácido 5-azido salicílico	60
4.9.3. Síntesis del ácido 8-(o-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico (AS86) a partir del AS8	61
4.10. Condiciones de fotólisis del AS86	64
4.10.1. Fotomarcación de la PMCA con AS86: Condiciones de fotólisis	64
4.10.2. Fotomarcación del péptido C28W con AS86	64

4.11. Fotomarcación hidrofóbica de proteínas con [¹²⁵I] TID-PC/16	66
4.11.1. Incorporación de ¹²⁵ I al precursor TID-PC/16	66
4.11.2. Fotomarcación de la PMCA	66
4.12.1. Fotomarcación de la PMCA	67
4.12.2. Proteólisis con V8 proteasa y electroforesis en geles de Poliacrilamida	68
4.12.3. Espectrometría de masa	68
4.13. Ajuste de Curvas y estimación de parámetros	69
4.14. Origen y calidad de las drogas utilizadas	70

PARTE III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 5: Actividad de la Bomba de Calcio de Membrana Plasmática reconstituida en micelas mixtas de detergente-fosfolípido	72
5.1. Introducción	72
5.2. La actividad Ca ²⁺ -ATPasa de la PMCA depende de la fracción molar de fosfolípidos y de la longitud de la cadena carbonada del fosfolípido	73
5.3. Fase de activación de la actividad Ca ²⁺ -ATPasa por fosfolípidos Neutros	76
5.4. Discusión	79
Capítulo 6: Estudio de la transición micela-vesícula en sistemas detergentes-fosfolípido	81
6.1. Introducción	81
6.2. La dispersión de luz aumenta a medida que se incrementa la X _{PC} del sistema lípido (PC)-detergente (C ₁₂ E ₁₀)	82
6.3. Caracterización del sistema fosfolípido/C ₁₂ E ₁₀ mediante la técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)	84
6.4. Efecto de la transición micela-vesícula sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa	86
6.5. La cantidad de PMCA activa es similar en sistemas pre y post transición micela-vesícula	87
6.6. Efecto de la transición micela-vesícula sobre la afinidad por Ca ²⁺	89
6.7. La caída de la actividad Ca ²⁺ -ATPasa se produce por una disminución en el número de recambio de la enzima (<i>turnover</i>)	90

6.8. Discusión	91
 Capítulo 7: Efecto de los fosfolípidos y la estructura lipídica sobre el tiempo de residencia del intermediario fosforilado. Relación estructura-función de la PMCA mediante simulaciones de dinámica molecular	 94
7.1. Introducción	94
7.2. Efecto de la fracción molar de fosfolípidos y su estructura sobre el tiempo de residencia de la PMCA en el intermediario fosforilado (EP)	95
7.3. Simulaciones de Dinámica Molecular de la PMCA incluida en bicapas de DMPC y DOPC	98
7.4. Discusión	99
 Capítulo 8: Modulación de la PMCA por ácidos grasos insaturados: Empleo de un análogo fotoactivable de ácido oleico	 102
8.1. Introducción	102
8.2. Caracterización del AS86	103
8.3. Modulación de la actividad de la PMCA por ácido oleico: Comparación con el efecto ejercido por el AS86	105
8.4. Efecto de la unión covalente del AS86 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa en presencia y ausencia de CaM	106
8.5. Área accesible a los lípidos en la PMCA en presencia de AS86: efecto de la unión covalente y no covalente	107
8.6. Reversión de la inhibición de la activación por CaM de la PMCA por C28W mediante la incubación con AS86	110
8.7. Discusión	112
 Capítulo 9: Detección del(los) sitio(s) de interacción del ácido oleico en la PMCA mediante el uso del AS86 y la espectrometría de masa: <i>Resultados Preliminares</i>	 114
9.1. Introducción	114
9.2. Proteólisis controlada de la PMCA con V8 proteasa	114
9.3. Detección de fragmentos fotomarcados de la PMCA mediante MALDI TOF-TOF	116

9.4. Discusión	120
-----------------------	------------

PARTE IV: DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 10: Discusión general	125
---------------------------------------	------------

10.1 Modulación de la PMCA por fosfolípidos neutros	125
--	------------

10.1.1 .Fase inhibitoria de la actividad Ca^{2+} -ATPasa	125
---	-----

10.1.2 .Fase de activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa	127
---	-----

10.2 Modulación de la PMCA por ácidos grasos insaturados	131
---	------------

10.2.1 El uso del AS86 como herramienta para el estudio de la modulación por ácidos grasos insaturados	131
--	-----

10.2.2 Avances en el uso de la espectrometría de masa para la detección de los sitios de unión de ácidos grasos insaturados	133
---	-----

PARTE V: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Capítulo 11: Conclusiones	138
----------------------------------	------------

Perspectivas	140
---------------------	------------

PARTE VI: REFERENCIAS

Capítulo 12: Referencias	142
---------------------------------	------------

PARTE I

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Sistemas para el estudio de proteínas integrales de membrana. Interacción lípido-proteína

1.1. Proteínas integrales de membrana: ¿Por qué estudiarlas?

Las proteínas de membrana son uno de los componentes más importantes de las biomembranas. Dada su significancia biológica y diversidad estructural, estas proteínas son valiosos objetos de estudio (1). En particular, aproximadamente el 60% de los fármacos que están en el mercado tienen como dianas a este tipo de proteínas (2). De acuerdo a su localización en la bicapa lipídica las proteínas de membrana se dividen entre integrales y periféricas. Las proteínas integrales se encuentran parcialmente insertas en la membrana o bien atravesando la bicapa lipídica y las periféricas se encuentran usualmente localizadas en la superficie de la membrana mediante interacciones con la parte polar de los lípidos y/o mediante unión directa a otras proteínas integrales. Éstas se pueden clasificar de acuerdo a su función en los diferentes procesos biológicos, por ejemplo, como receptores, transportadores, canales iónicos, etc.

La función biológica de muchas proteínas de membrana es sensible al tipo de lípidos presente en las preparaciones utilizadas para su estudio. Los mecanismos responsables de estos cambios de la actividad, y cómo se expresan a partir de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana, conforman un área muy activa de estudio (3).

El sólo hecho de estudiar la estructura y función de las proteínas de membrana y analizar las interacciones lípido-proteínas es de gran importancia para la comprensión de las biomembranas. El estudio de estos procesos será fundamental para identificar y desarrollar nuevas estrategias de prevención, diagnóstico y cura de patologías que tengan un componente relacionado con los lípidos en su epidemiología.

1.2. Estrategias y herramientas para el estudio diferencial de las proteínas integrales de membrana

1.2.1. Biomembranas

Las membranas biológicas están principalmente compuestas por lípidos y proteínas y constituyen los límites de todas las células. Los constituyentes lipídicos mayoritarios de las biomembranas son los fosfolípidos cuya característica común con los glicolípidos y los esteroides (otros de los constituyentes básicos) es su naturaleza tanto hidrofóbica como hidrofílica, de manera que se comportan como moléculas anfifílicas. Como consecuencia de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de ácidos grasos y las interacciones de las cabezas polares con el medio acuoso, los fosfolípidos y glicolípidos se organizan espontáneamente en bicapas dentro de las cuales las moléculas de esteroides se pueden insertar.

En 1972, Singer y Nicholson (4) proponen uno de los primeros modelos de organización de membranas biológicas, el modelo de "mosaico fluido". En este modelo, se considera a la membrana como una solución bidimensional viscosa de fosfolípidos en la que se encuentran insertas las proteínas con una distribución aleatoria. A su vez, este modelo indicaba que las proteínas podían difundir libremente por la solución lipídica, formar asociaciones entre ellas o bien con alguna especie lipídica en particular.

Posteriormente, el modelo de "mosaico fluido" se complementó con nuevas evidencias. El estudio fisicoquímico de lípidos, por medio de técnicas novedosas, y la exploración biofísica *in vitro* e *in situ* de proteínas de membrana generaron nuevos aportes para dilucidar los aspectos estructurales y funcionales de las membranas biológicas. Algunas de las modificaciones al modelo de mosaico fluido provinieron de observar la riqueza en la composición química de los fosfolípidos y las proteínas presentes en las membranas. En particular, se estima que aproximadamente el 30% de las proteínas codificadas en el genoma del *Homo sapiens* son proteínas de membrana (5). Esto destaca la relevancia de las proteínas integrales y superficiales de membrana en la fisiología celular normal y patológica. Posteriormente se comenzó a cuestionar la propuesta inicial sobre la distribución al azar de los componentes en la membrana celular. Si bien no hay medidas precisas de la energía de interacción entre todos los

pares posibles presentes en las membranas, diversos fenómenos señalarían que las interacciones involucrarían una mayor energía que la térmica y que la distribución de los componentes no sería al azar (6,7). En este sentido, la demostración de la existencia de dominios lipídicos con distinta fluidez (balsas lipídicas o “*lipid rafts*”), regiones con alta concentración de esteroides y esfingolípidos asociadas con varias proteínas de transporte y señalización (8) y las comprobadas interacciones específicas entre la membrana y el citoesqueleto subyacente (9), refuerzan la idea de una distribución no aleatoria de los componentes.

Si bien se cuenta con una gran cantidad de evidencias con respecto a la estructura y propiedades de las biomembranas (10-16) nuestro entendimiento de estas complejas estructuras permanece incompleto. Sin embargo, es claro que además de funcionar como una barrera que protege a la célula, las membranas biológicas están también involucradas en procesos biológicos esenciales como la transducción de señales, transformaciones energéticas, el transporte de iones y otras moléculas a través de la membrana, entre otras (17).

1.2.2. Sistemas de reconstitución para el estudio de proteínas de membrana

Las proteínas de membrana son difíciles de estudiar por varias razones. Una de las dificultades que se presentan en el estudio y la caracterización de dichas proteínas es encontrar un sistema de reconstitución apropiado, aparte de los problemas asociados a la sobreexpresión de estas proteínas y su purificación. La experiencia ha indicado que dos proteínas con alta homología pueden comportarse de manera diferente en un mismo sistema de reconstitución. Una vez solubilizadas en detergentes, muchas proteínas de membrana son poco estables, tienden a desnaturalizarse y formar agregados, lo que dificulta aún más el estudio estructural de estas proteínas por los métodos tradicionales. El entorno nativo de las biomembranas le brinda estabilidad a estas proteínas a través de su composición lipídica particular y sus propiedades fisicoquímicas (13). Sin embargo, dada la heterogeneidad y la insolubilidad en medios acuosos de las biomembranas, ha sido difícil obtener información estructural utilizando métodos como la cristalografía de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

De estas cuestiones se desprende la necesidad de estudios integrales de sistemas de reconstitución anfífilos que permitan indagar el comportamiento y estructura de las proteínas de membrana. Aquí citamos algunos de los más utilizados, focalizándonos en los que sirvieron para el estudio de la PMCA y otras ATPasas.

1.2.2.1. Fragmentos de membranas celulares.

Uno de los primeros sistemas utilizados para el estudio integral de distintas proteínas de membrana fueron los fragmentos de membranas celulares obtenidos luego de la lisis celular y eventual separación diferencial de las distintas fracciones lipoproteicas (membrana plasmática y organelas en eucariotas).

Estos sistemas permitieron, por ejemplo, demostrar la existencia del transporte de iones y la actividad Ca^{2+} -ATPasa (18) en membranas de eritrocitos humanos y posteriormente, mediante el uso de membranas libres de calmodulina, la caracterización del ciclo catalítico de la PMCA (19). En particular, para el estudio del transporte de Ca^{2+} se utilizaron (y aún se utilizan) vesículas invertidas –esto es, con la cara intracelular hacia el exterior- preparadas directamente a partir de membranas de eritrocitos. Esto permite que las vesículas ingresen iones Ca^{2+} en presencia de ATP por acción de la PMCA.

1.2.2.2. Proteoliposomas.

Las vesículas de fosfolípidos que contienen proteínas de membrana se conocen como proteoliposomas y han sido herramientas muy útiles en la elucidación de la estructura y función de diversas proteínas de membrana.

Existen varios criterios que los proteoliposomas deben cumplir para ser considerados sistemas adecuados para los estudios funcionales. Entre algunos de esos criterios se hallan una distribución homogénea de tamaño, que las moléculas de proteínas se encuentren distribuidas de manera homogénea entre los liposomas y que la actividad enzimática de la proteína que se encuentra integrada sea adecuada (20,21).

Estos sistemas han sido útiles para estudios que involucran transporte de iones a través de membranas y allí cobra importancia la necesidad de que la mayoría de las proteínas insertas se encuentren correctamente orientadas (22).

Existen pocos estudios en los que se ha utilizado este sistema para la reconstitución de la PMCA (23,24). En general, esta proteína es inestable y es difícil mantener una actividad óptima luego de su reconstitución en liposomas, que incluye la extracción de la proteína con detergente, el agregado de fosfolípidos y la posterior remoción del detergente por diálisis o empleando esferas de poliestireno adsorben compuestos hidrofóbicos como las BioBeads™ (25).

1.2.2.3. Micelas

Dado que en ésta tesis se trabajó con un sistema micelar, haremos mayor hincapié en la descripción de dichos sistemas.

1.2.2.3.1. Formación de micelas

Se denominan anfifilos a los compuestos cuya estructura molecular incluye una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (26). El grupo polar del anfifilo es denominado cabeza mientras que el grupo no polar, es la cola.

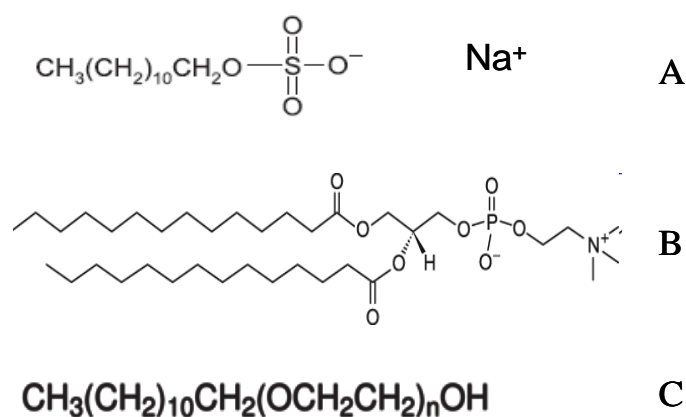


Figura 1.1. Se representan las estructuras de A) el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), B) un miembro de la familia de las fosfatidilcolinas C) un detergente de la familia de los polioxietilenglicoles C_{12}E_n (en la mencionada nomenclatura, C_n y E_n representan los grupos metileno y etilenglicol, respectivamente).

A bajas concentraciones, los anfifilos son poco solubles en agua ya que la interacción entre la cola no polar y el solvente es desfavorable. La pequeña solubilidad es consecuencia del ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de las colas no polares, con lo cual se maximiza la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas del solvente (27).

Al aumentar la concentración, se observa un equilibrio entre las moléculas del anfifilo monoméricas y agregados de anfifilos o micelas, en los cuales las colas hidrofóbicas están en contacto entre sí y las cabezas polares se exponen al solvente.

1.2.2.3.2. Formas y tamaños de las micelas

En la formación de las micelas intervienen dos tipos de fuerzas opuestas. La primera surge del efecto hidrofóbico y redundará en la interacción entre las colas de los anfifilos. La segunda es el resultado de la repulsión entre las cabezas polares de igual carga de los anfifilos. El tamaño y la forma de las micelas están determinados por el balance entre ambas fuerzas (28), que a su vez depende en forma directa de la estructura química de las moléculas de anfifilos. La geometría de las micelas está relacionada con el volumen de la parte hidrofóbica de la molécula (v) la longitud de la cadena no polar (l) y la fracción del área de la micela ocupada por cada cabeza polar (S). El volumen (V) y área (A) de la micela están relacionados con los parámetros geométricos del anfifilo mediante:

$$A = N_A \cdot S$$

$$V = N_A \cdot v$$

donde N_A , es el número de agregación que expresa el promedio de moléculas de anfifilo que integran la micela. Las cadenas no polares de los anfifilos se disponen de manera de evitar la formación de cavidades dentro de la micela lo que implica que la forma geométrica que adopte la micela estará además condicionada por la longitud de la cadena no polar. Por ejemplo para una micela esférica:

$$A = N_A \cdot S = 4\pi r^2$$

$$V = NA \cdot v = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Dividiendo V por A y considerando que el radio de la micela (r) deberá ser igual o menor al largo de la cadena hidrofóbica (l) se obtiene que:

$$v/IS \leq 1/3$$

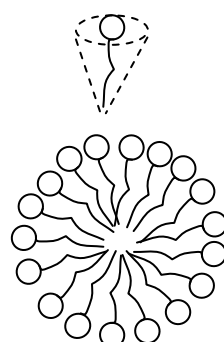
Es decir que para que un anfifilo pueda formar micelas esféricas, su forma geométrica debe ser tal que la relación v/IS sea, a lo sumo, $1/3$. El valor máximo que puede tomar v/IS para que un anfifilo pueda formar micelas de otras formas geométricas puede calcularse de manera similar (29). De esta manera, anfifilos cuyo $v/IS \leq 1/3$ forman micelas esféricas mientras que fosfolípidos cuyo v/IS está en el rango de $1/2 - 1$ forman bicapas.

Si bien, como se muestra en la **Figura 1.2**, la forma geométrica del anfifilo determina que este tiende a formar micelas esféricas, ésta esfericidad se ve limitada por la cantidad de monómeros que pueda incorporar la micela. Se puede calcular que para un anfifilo cuya cadena hidrofóbica posee 14 átomos de carbono, el máximo número de monómeros que admite una micela esférica es 56 (28). Se requiere de una distorsión de la esfericidad de la micela para que esta pueda incorporar un número mayor de moléculas de anfifilo.

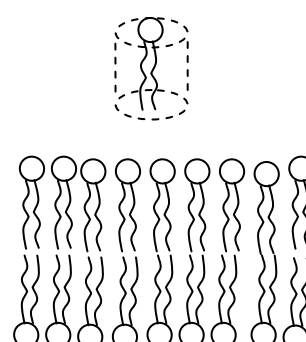
Forma geométrica del
anfifilo

Forma geométrica de
la micela

Ejemplo



Lisofosfatidilcolina



Fosfatidilcolina

Figura 1.2: Modelo geométrico de micelas y bicapas lipídicas.

La alternativa más simple en este caso es que las micelas adopten una forma de elipsoide de revolución en el que sólo uno de los semiejes está limitado por la longitud de la cadena hidrofóbica de los anfifilos individuales. Es posible incorporar hasta 220 moléculas de un anfifilo cuya cadena hidrofóbica posee 14 átomos de carbono si la micela adopta una forma de oblato con una relación entre los semiejes del elipsoide $a_0/b_0 = 2$.

Robinson y Tanford (30) consideran que cuando una proteína de membrana se inserta en una micela de detergente, la forma y el número de agregación de la micela permanecen inalterados. Según estos autores, las proteínas actúan únicamente como un núcleo para la formación de las micelas. Møller y le Maire (31) señalan que en el caso de una proteína cuya región transmembrana es de gran tamaño esta hipótesis no sería válida. En estos casos se requeriría un gran número de moléculas de anfifilo para cubrir la superficie hidrofóbica de la proteína de manera que el número de agregación de las micelas que contienen la proteína de membrana sería mayor que el de las micelas vacías. El resumen de los posibles modelos de interacción entre una proteína de membrana y el detergente que forma la micela se muestran en la **Figura 1.3**.

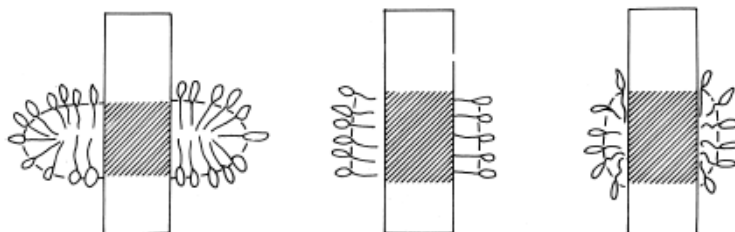


Figura 1.3. Modelos de unión de detergentes no desnaturizantes a proteínas integrales de membrana. En el primer modelo (A) el detergente formaría un elipsoide de tipo oblato en el que la proteína se hallaría inserta. En el segundo modelo (B), el detergente adoptaría una disposición de monocapa dejando cadenas hidrofóbicas expuestas en los extremos. El tercer modelo (C) corresponde a un elipsoide de tipo prolato. (Modificado de Møller y Le Marie, 1993)

1.2.2.3.3. Micelas mixtas

Considerando que las fuerzas involucradas en la formación de micelas no son específicas del tipo de anfifilo, al adicionar en un medio acuoso dos o más especies distintas de anfifilos se pueden formar micelas mixtas donde los distintos anfifilos estarán presentes.

Los aspectos termodinámicos de la formación de este tipo de micelas fueron estudiados por Tanford (1980) (28) en sistemas compuestos por dos anfifilos diferentes para los cuales vale el modelo de separación de fases (si el NA es ≥ 50 y la temperatura es moderada, se considera que el potencial químico de los anfifilos en la micela ($\mu_{\text{anf(mic)}}$) es similar al potencial químico de referencia correspondiente a la situación hipotética en la que el sistema está formado únicamente por micelas ($\mu_{\text{anf(mic)}}^0$). En estas condiciones, las micelas pueden ser tratadas como una fase pura separada del resto de la solución. El sistema formado puede tratarse termodinámicamente como un sistema de dos fases con dos componentes. Este modelo sólo se aplica si no existen interacciones entre los anfifilos (26).

Un sistema ideal de micelas mixtas obedecerá una ley similar a la de Raoult :

$$(2.1) \quad \text{CMC}_i = X_{i,w} = X_{i,\text{mic}} \cdot X_{i,w}^* = X_{i,\text{mic}} \cdot (\text{CMC})_i^*$$

donde i refiere a cada especie de anfifilo componente de las micelas y el superíndice $*$ indica la condición de micelas puras formadas por el anfifilo i .

La ecuación 2.1 muestra que el agregado de un segundo anfifilo produce una disminución de la concentración micelar crítica del primero.

1.2.2.3.4. Sistemas fosfolípido-detergente

1.2.2.3.4.1. Modelo de tres estados

El proceso de disolución de liposomas utilizando detergente fue exhaustivamente estudiado utilizando diversas técnicas, incluyendo turbidimetría (32), dispersión cuasielástica de luz (33), transferencia de energía (34), resonancia magnética nuclear (35), centrifugación analítica (32) y microscopía electrónica (36). Los resultados de estos estudios sugieren que este proceso incluiría tres estados (37) (38).

Como podemos ver en el esquema de la **Figura 1.4**, en una primera etapa (previa a la línea 1), el detergente comienza a particionarse en los liposomas, presentándose un cambio muy leve en la turbidez. Entre las líneas 1 y 2, la concentración del detergente se aproximaría a valores saturantes y se formarían liposomas saturados de detergente. En esta situación, ocurre la transición bicapa-

micelas globulares. Luego de la línea 2, la mayoría de los liposomas están disueltos en micelas mixtas, alcanzando eventualmente, la solubilización total.

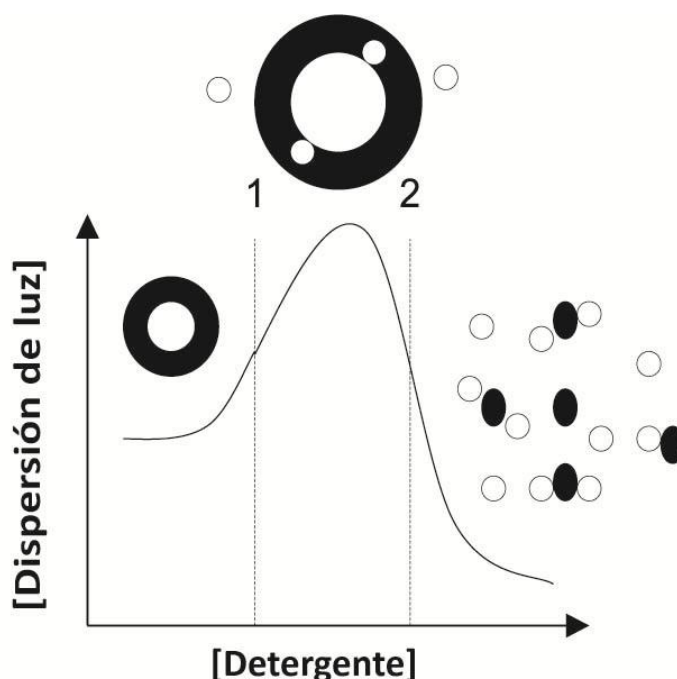


Figura 1.4: Diagrama esquemático que muestra la transición de fase desde liposomas a micelas causadas por la partición del detergente en bicapas. Las líneas negras gruesas representan lípidos o liposomas; los círculos blancos abiertos son moléculas de detergente. La línea llena representa el cambio en la turbidez de la muestra en los diversos estados, seguido por el fenómeno de dispersión de luz. Las líneas punteadas estiman las transiciones de fase. Tomado de Seddon y col., 2004(39).

1.2.2.3.4.2. Sistemas fosfolípido-detergente-proteína

Los estudios estructurales y funcionales de proteínas de membrana en el entorno nativo se ven restringidos por la complejidad de dichos sistemas (40). Por este motivo, muchas veces es necesario extraer la proteína de la membrana y reconstituirla en un sistema artificial.

Los sistemas más utilizados para la reconstitución son las bicapas artificiales y las micelas compuestas por detergente o por fosfolípidos y detergente. Se considera que el sistema micelar es adecuado si las proteínas de membrana conservan sus propiedades funcionales (41).

Robinson y Tanford (1975) estudiaron el modo de interacción de proteínas de membrana con micelas de detergente. Estos autores consideran que la región transmembrana de las proteínas actúa únicamente como un núcleo para la formación de las micelas, sin alterar el número de agregación de las mismas.

Moeller y le Maire (1993) señalan que esta hipótesis no sería válida para proteínas cuyas regiones transmembrana poseen un gran tamaño. En este caso, se requeriría un gran número de anfifilos para cubrir la superficie hidrofóbica de las regiones transmembrana. Como consecuencia, el número de agregación de las micelas en las cuales se encuentra incluida la proteína sería mayor que el de aquellas carentes de proteína.

Las interacciones entre los anfifilos y la proteína cuando es solubilizada en micelas, fueron estudiadas por Volwerk y col. (42) utilizando sondas de ESR (Resonancia de espín electrónico). Estos autores, observaron la aparición de una población de anfifilos con movilidad restringida cuando se incorpora la proteína citocromo c oxidasa en micelas de fosfolípido y detergente. Estos anfifilos integrarían una monocapa rodeando la superficie hidrofóbica del dominio transmembrana de la proteína y se encontrarían en un equilibrio dinámico de intercambio con aquellos que se encuentran en el seno de la micela. La composición de la monocapa estaría determinada por la composición de las micelas y la afinidad de fosfolípidos y detergente por la superficie de la región transmembrana de la proteína.

1.2.3. Sondas fotoactivables para el estudio de proteínas de membrana y biomembranas

1.2.3.1. Generalidades

Una sonda fotoactivable es una molécula que posee en su composición un grupo fotosensible. Este grupo es estable químicamente pero al ser irradiado con luz ultravioleta se convierte en una especie altamente reactiva. Dicha especie es capaz de reaccionar con cualquier átomo que se encuentre en su entorno inmediato con un tiempo de latencia que va desde los microsegundos a los picosegundos según su reactividad y entorno (43-45). La región de la molécula (o macromolécula) blanco a la que el reactivo se une covalentemente dependerá de la interacción que se establezca entre ambas especies.

El concepto de fotomarcación por afinidad fue propuesto por primera vez en 1962 por Westheimer y col. (46) y luego fue implementado para el estudio de biomembranas (47). Los grupos fotoactivables más utilizados son las azidas, diazirinas,

diazo compuestos y sales de diazonio (entre otros). De acuerdo a la especie reactiva generada por la fotoactivación pueden ser clasificados en nitrenos, carbenos y carbocationes, respectivamente. La reactividad de las sondas fotoactivables radica principalmente en la naturaleza de la entidad química. Por otro lado, los tiempos de vida de los intermediarios reactivos dependen mayoritariamente de la entidad química y de la correspondiente "decoración" de la estructura, como también del solvente, la temperatura, pH, etc. En este sentido, las especies más utilizadas, como los nitrenos y carbenos, tienen tiempos de vida que van desde microsegundos a nanosegundos (43).

Es deseable que la fotomarcación ocurra de manera indiscriminada, es decir, que el grado de marcación de una determinada región de la molécula en estudio se encuentre directamente relacionado con la interacción que se establece entre ésta y el reactivo fotoactivable. Se pueden definir entonces varias condiciones que idealmente debería cumplir un reactivo fotoactivable.

I. *Baja selectividad*: En la mayoría de los casos no se conoce *a priori* la estructura química de los sitios moleculares con los que interacciona el reactivo fotoactivable. Esta circunstancia hace deseable que el reactivo pueda unirse indiscriminadamente a cualquier función química, inclusive a los átomos que están formando parte de enlaces C-H. La falta absoluta de selectividad es una idealización; aún las especies más reactivas presentan cierto grado de preferencia por algunos átomos o grupos químicos.

II. *Corta vida media de los intermediarios*: Las especies reactivas deberían existir sólo el tiempo suficiente como para reaccionar con la molécula vecina. Idealmente, este tiempo debería ser insuficiente para que las especies reactivas difundan y para que se produzcan en ellas reordenamientos intramoleculares que las transformen en especies no reactivas. Ambos fenómenos, la difusión y el reordenamiento intramolecular, tienen como consecuencia una menor eficiencia de la marcación.

III. *Reducido tamaño del grupo fotoactivable*: El grupo fotoactivable deberá modificar lo menos posible el sistema en estudio. No deberá cambiar las características topográficas y fisicoquímicas del reactivo en el que se introduce ni deberá alterar la interacción que el reactivo establece con la molécula en estudio.

IV. *Alta estabilidad*: El reactivo fotoactivable deberá ser estable en la oscuridad. Además, la radiación ultravioleta empleada para la fotoactivación no deberá alterar

químicamente la molécula en estudio. Por último, los fotoaductos generados deberán ser estables para permitir su aislamiento, caracterización y análisis.

Los primeros lípidos fotoactivables, fueron sintetizados en los 70 's por Khorana y colaboradores (48). Estos reactivos contenían azidas (y grupos diazo) en diferentes posiciones de los lípidos (47). El trabajo de estos investigadores, demostró que las sondas fosfolípídicas de origen sintético, tal y como sus contrapartes naturales, podían formar vesículas y la fotólisis de esas estructuras resultaba en la formación del productos de mayor peso molecular indicando la formación de aductos de entrecruzamiento (*cross-linking*) intramolecular con las cadenas de ácido graso. Desde ese momento, se han desarrollado una gran variedad de sondas lipídicas fotoactivables: fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, etc. Este tipo de sondas han sido, y actualmente son, de gran interés y utilidad para insertarlos en las biomembranas y caracterizar las interacciones de las proteínas integrales con su entorno lipídico.

1.2.3.2. Grupos fotoactivables de interés: Azidas, diazirinas y diazo compuestos

Los grupos fotoactivables más utilizados son las azidas, las diazirinas y los diazo compuestos. Por irradiación se generan nitrenos a partir de las azidas y carbenos a partir de las diazirinas y los diazo compuestos. Tanto los carbenos como los nitrenos son especies singlete o triplete es decir que, presentan orbitales semiocupados con espines opuestos o paralelos respectivamente. Debido a su deficiencia electrónica, las especies singlete son electrófilos muy poderosos y reaccionan muy bien con los átomos que tienen electrones formando parte de dobles enlaces y con los heteroátomos (S, O, N, etc.) que poseen pares de electrones que no forman parte de enlaces.

Las azidas son los precursores más utilizados en sondas fotoactivables para generar nitrenos. La popularización en el uso de las azidas está dada por el reducido tamaño relativo del grupo azido y la facilidad con la que se puede introducir en la molécula que le da especificidad a la sonda. Además cuentan con estabilidad química en la oscuridad y una gran reactividad ante la fotoirradiación. En este sentido, las aril azidas son ampliamente utilizadas a diferencia de las alquil azidas, que tienen pocas aplicaciones debido a su pobre estabilidad (49). A partir del trabajo pionero de Khorana y colaboradores (47) donde sintetizaron los primeros lípidos fotoactivables, se

desarrollaron varias sondas fosfolipídicas fotoactivables que contenían grupos azido. En 1980, Brunner y col. sintetizaron el grupo p-azidofenilo conteniendo fosfatidilcolina para estudiar la gramicidina A (50).

Las fenilazidas no substituidas tienen su máximo de absorción alrededor de 260 nm, esto implica que la fotoactivación más efectiva será alcanzada alrededor de los 260 nm. Sin embargo, la irradiación a esta longitud de onda podría causar un daño considerable a ciertas macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos, ya que tienen una máxima absorción alrededor de 260-280 nm debido a la presencia de residuos aromáticos de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente.

La fotoquímica de las arilazidas ha sido investigada extensivamente y en la **Figura 1.5** podemos observar que luego de la fotoactivación, la azida es activada para formar un nitreno singlete (S1) acompañado por la liberación de nitrógeno (N_2). El nitreno singlete (S1) se inserta en enlaces carbono-hidrógeno o heteroátomo-hidrógeno (Vía A), pero también existe la posibilidad de la expansión del anillo y el subsecuente rearreglo a ketenimina (Vía B), o bien la formación de un intermediario triplete (T1) vía la conversión intersistema (ISC) (Vía C). Sólo la vía A generará una fotomarcación eficiente porque, en la vía B, la ketenimina va a reaccionar preferiblemente con nucleófilos (hidroxilo, amino, sulfhidrilo, etc.) para generar azepina y en la vía C, el nitreno triplete requiere la abstracción de un hidrógeno radical para aparearse y formar el producto de inserción (51). Una estrategia que se diseñó para evitar las vías secundarias fue la incorporación de átomos de flúor en el anillo. Estos sustituyentes atractores de electrones favorecen la reactividad del aril nitreno para la inserción (vía A) (52), mientras que desfavorecen la expansión de anillo (53). Si bien la incorporación del átomo de flúor mejoró la eficiencia de fotomarcación de las arilazidas, estos reactivos tienen varias desventajas: los nitrenos son menos reactivos que los carbenos para marcar entornos hidrofóbicos (46,54) y la reacción de inserción de los nitrenos forma enlaces carbono-nitrógeno o heteroátomo-nitrógeno que podrían ser sensibles en un tratamiento post marcación, dificultando así los análisis de los productos fotomarcados.

Como adelantamos, existen otras moléculas fotoactivables como las diazirinas y los diazo compuestos que también han sido de gran utilidad en la realización de

fotomarcaciones en biomembranas y que superan algunas de las dificultades mencionadas para las azidas.

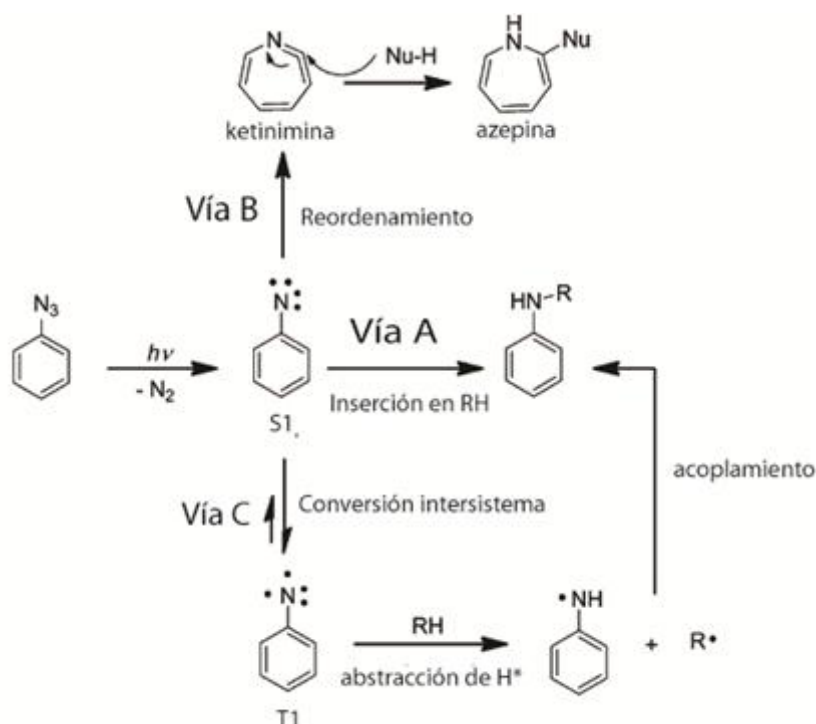


Figura 1.5: Las reacciones fotoquímicas de la fenilazida. Ver detalles en el texto. Modificado y adaptado de Xia & Peng (48).

Los diazo compuestos, presentan un grupo diazo que, de manera similar al grupo azido, es de tamaño pequeño y fácil de introducir en las moléculas de interés. Como tal, el primer ejemplo de fotomarcación de afinidad fue realizado con diazo acetato (46). Luego, se desarrollaron las diazocetonas como reactivos fotoactivables. Estos compuestos, luego de la irradiación se descomponen para producir un carbeno altamente reactivo y liberar nitrógeno (55) (**Figura 1.6**). Las diazirinas, al igual que los diazo compuestos, generan carbenos altamente reactivos cuando son expuestas a la luz o a la termólisis. Como se puede ver en la **Figura 1.6**, la diazirina se activa por fotoirradiación para formar el carbeno reactivo, además puede tener el intermediario diazo correspondiente, que atraviesa una fotólisis posterior para producir más carbeno (49,56).

Las primeras diazirinas usadas para marcar proteínas integrales de membrana y biomembranas fueron las arildiazirinas (57). Poco después, Brunner y col.

desarrollaron las diazirinas más potentes para la fotomarcación: las aril-trifluorometil diazirinas (58) (**Figura 1.6**).

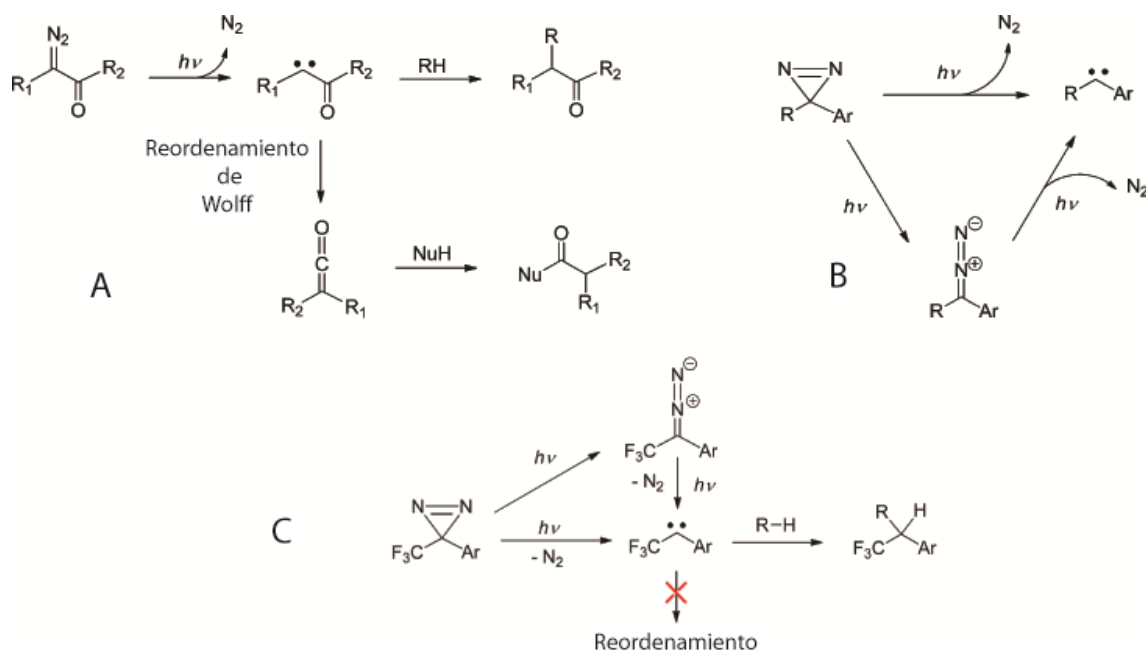


Figura 1.6: Las reacciones fotoquímicas de las diazocetonas (A), las diazirinas (B) y las aril-trifluorometildiazirinas (C). Ver detalles en el texto. Modificado y adaptado de Xia & Peng (48).

Comparadas con otras diazirinas, las aril-trifluorometildiazirinas presentan una mejor estabilidad química y térmica gracias a los grupos arilo y trifluorometilo (56). Además, su absorción máxima se observa alrededor de los 360 nm, una longitud de onda favorable para el trabajo con macromoléculas ya que se evita el posible daño fotoquímico.

Si bien las diazirinas parecieran ser los grupos más promisorios y convenientes para la fotomarcación de afinidad, continúa siendo un desafío su incorporación en las diferentes moléculas de interés de manera simple y conveniente por lo que esta dificultad práctica constituye el mayor impedimento para su uso (56,59).

1.2.3.3. Métodos de detección y análisis de los aductos de fotomarcación: ventajas y limitaciones

Luego de la elección de la sonda con el grupo fotoactivable que sea más conveniente, el siguiente aspecto a tener en cuenta para la realización de un experimento de fotomarcación es la correcta incorporación de la sonda en el entorno

de la proteína. El método de elección dependerá del tipo de experimento que se desee realizar y de la naturaleza de la sonda.

El siguiente paso a tener en cuenta en el proceso de fotomarcación es el análisis e identificación de la sección de la proteína marcada (o bien los lípidos marcados, según el experimento). La gran hidrofobicidad de las proteínas de membrana (especialmente de las proteínas integrales) dificulta el proceso de identificación y aislamiento de los aductos, impidiendo el análisis subsiguiente (39). A través de los años, se han unido a las sondas lipídicas varios tipos de sistemas que permitieron la detección de los productos de *cross-linking*: isótopos radiactivos, biotina, *tags* fluorescentes, etc. En los primeros estudios de fotomarcación que se realizaron y que aún se realizan en la actualidad, las proteínas fotomarcadas eran identificadas y separadas utilizando SDS-PAGE, para luego detectar el aducto mediante la marca presente en la sonda fotoactivable. Gran cantidad de estudios han utilizado esta técnica para extraer distinto tipo de información de las proteínas de membrana y su entorno. En particular, ha sido extensamente utilizada en estudios estructurales (60), en el mapeo de la interfase lípido-proteína (61) y en el análisis de interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (62-65). Más recientemente, en nuestro laboratorio, se han realizado estudios conformacionales de proteínas de membrana (66-69) utilizando esta estrategia experimental y un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina marcado con ¹²⁵I. Para estos fines, también se ha utilizado la separación mediante SDS-PAGE y posterior análisis de los aductos mediante espectrometría de masa. Por ejemplo, en el trabajo de Janssen y col., se marcó una proteína de 70 kDa con un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina, se aisló posteriormente mediante electroforesis en 2D y mediante análisis por espectrometría de masas se pudo identificar como la Gut2p mitocondrial de levaduras (70,71).

En los últimos años, ha cobrado interés la utilización del acople de la cromatografía de alta performance (HPLC) con la espectrometría de masa para el análisis de los aductos formados entre las proteínas, lípidos y las sondas fotoactivables. Ha sido de elección debido a su velocidad, sensibilidad, precisión y el hecho de no usar sondas radiomarcadas (72-74). Gubbens y col. utilizaron la estrategia de cromatografía líquida (LC) “on-line” acoplada con espectrometría de masa (específicamente MS/MS) para estudiar los potenciales candidatos involucrados en la interacción de proteínas

con la membrana mitocondrial interna de *S. cerevisiae*, utilizando un análogo fotoactivable de fosfatidiletanolamina (75).

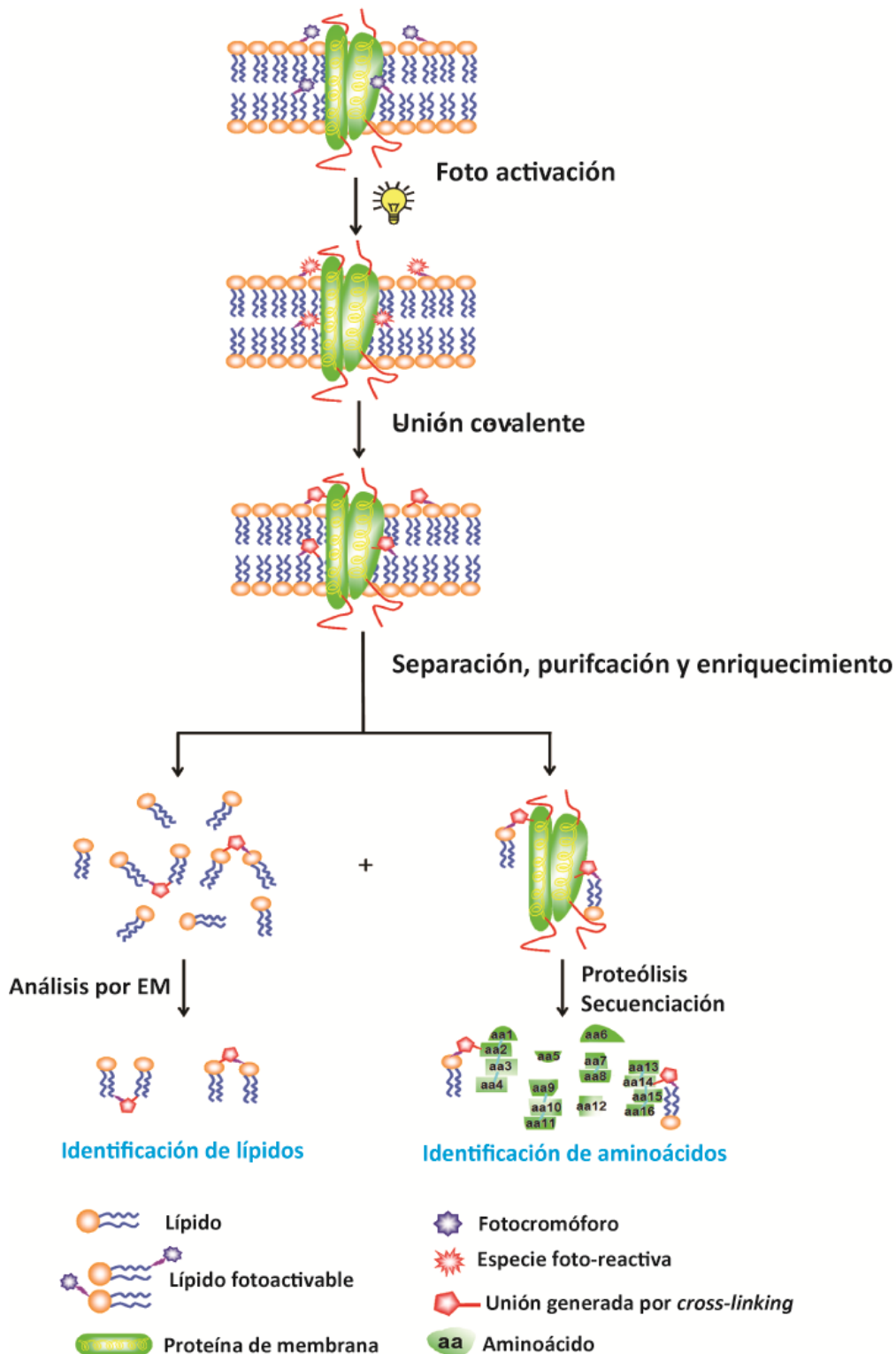


Figura 1.7: Diagrama esquemático de un proceso de fotomarcación de afinidad y posterior identificación de moléculas lipídicas y aminoácidos. Adaptado y modificado de Xia & Peng (48).

Posteriormente, el mismo grupo continuó utilizando la estrategia de LC-MS/MS para analizar proteínas de la membrana interna mitocondrial marcadas con sondas fosfolípicas biotiniladas. Esta estrategia les permitió establecer las proteínas que interactúan con fosfatidilcolina, y descubrir que ciertas proteínas, que se creía formaban parte de la membrana externa, en realidad se ubicaban en la interna mitocondrial (46)

1.3. Interacción lípido-proteína

La actividad de las proteínas integrales de membrana es afectada por la estructura de las moléculas lipídicas que las rodean en la membrana. Estas proteínas no son entidades rígidas y se ha demostrado que se deforman para asegurar un adecuado ajuste a la bicapa lipídica circundante. Por otro lado, los lípidos circundantes presentan también una gran complejidad y su comportamiento se aleja de la noción de ser un simple fluido bidimensional en el que se encuentran inmersas las proteínas integrales de membrana.

1.3.1. Tipos de interacción lípido-proteína

En términos de interacciones lípido-proteína, podemos definir 3 tipos de poblaciones lipídicas que conviven en los alrededores de las proteínas de membrana. Las interacciones que se definen entre estas poblaciones lipídicas y las proteínas de membrana (**Figura 1.8**) fueron determinadas de acuerdo al tiempo de residencia relativa de un lípido particular en la interfase proteína-lípido (15). Definiremos por un lado a la población de lípidos *bulk* (o lípidos co-solventes), a la población de lípidos anulares y finalmente la población de los lípidos estructurales. Esta diferenciación proviene, en gran parte, de resultados obtenidos con la técnica de espectroscopía de resonancia de espín electrónico (76).

Por un lado, se denominan lípidos co-solvente ("*bulk*" en inglés) a aquellos lípidos que muestran interacciones débiles y no específicas con la proteína. Estos lípidos presentan una rápida tasa de intercambio respecto a otros lípidos cercanos y por lo tanto bajos tiempos de residencia. Por otro lado, los denominados lípidos anulares, presentan características diferenciales: las proteínas pueden interactuar

específicamente con la cabeza polar hidrofílica de estos lípidos y presentan fuertes interacciones hidrofóbicas con ellos de acuerdo al largo y/o estado de saturación de la cadena hidrocarbonada. Estos lípidos presentan mayores tiempos de residencia y por lo tanto su tasa de intercambio respecto al resto de la membrana (*bulk*) es menor. El término anular hace referencia a que los mismos rodearán preferentemente a la proteína conformando un anillo compuesto por 50-100 moléculas, aproximadamente (**Figura 1.8**). La composición de las capas anulares puede ser variable y depende del conjunto de interacciones particulares que se produzcan en esta región y la composición global de la membrana en cuestión (77). Es interesante notar que las interacciones que se presentan entre estas capas anulares y los segmentos transmembrana (o de interfase) de las proteínas, pueden generarse de acuerdo a distintas selectividades determinadas por el largo de cadena carbonada del fosfolípido como por la naturaleza de la cabeza polar (78). Así, los lípidos anulares conforman un micro-entorno que afecta directamente a la actividad de la proteína a partir de interacciones transitorias con la región transmembrana. Finalmente, se define la tercera población: los lípidos estructurales. Éstos se caracterizan por presentar una gran afinidad por las moléculas proteicas y en experimentos de cristalografía de rayos X, se ha observado que los lípidos estructurales co-cristalizan con la proteína. Por ejemplo, en la estructura cristalográfica de la citocromo oxidasa se resolvieron 13 moléculas de lípidos: 2 cardiolipinas, 1 fosfatidilcolina, 3 fosfatidiletanolaminas, 4 fosfatidilglicerol y 3 triglicéridos, cada uno unido a sus sitios específicos (79). También se los puede hallar en sitios específicos en la interfase entre proteínas que integran multímeros o grandes complejos proteicos (3). En algunos casos, la presencia de una determinada especie lipídica se vuelve indispensable para el funcionamiento de la proteína (80). En el caso del canal de potasio KcsA, se demostró el papel funcional de los lípidos aniónicos unidos en interfaces proteína-proteína en su estructura homotetramérica (81) y se observó que en ausencia de los lípidos aniónicos, disminuye la probabilidad de apertura del canal (82).

1.3.2. Ajuste hidrofóbico y presión lateral

Como sabemos, la exposición total o parcial al medio acuoso de aminoácidos hidrofóbicos o de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos es energéticamente

desfavorable. Por este motivo, cuando el grosor del dominio transmembrana es distinto al espesor de la bicapa, los fosfolípidos y la proteína se reorganizan de modo de disminuir dicha exposición, fenómeno que se denomina ajuste hidrofóbico (84). En este tipo de interacciones es posible que las proteínas se ubiquen en un ambiente lipídico particular que satisfaga el recubrimiento de los segmentos transmembrana, al mismo tiempo que su estructura se adapta conformacionalmente a este entorno (Figura 1.9).

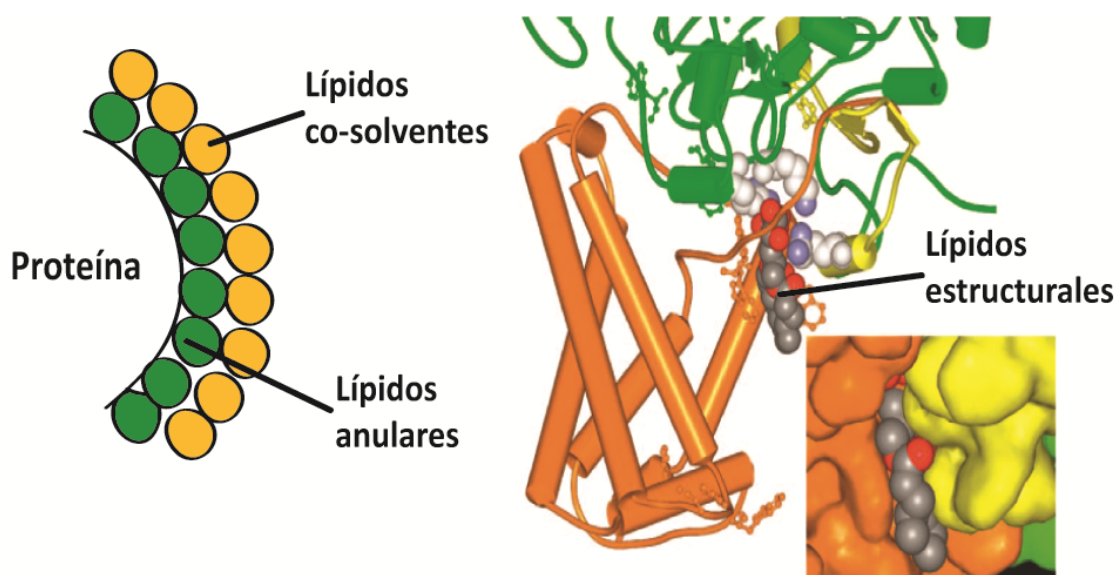


Figura 1.8: Interacciones lípido proteína. *Izquierda*, vista esquemática de una membrana desde arriba, se observan (verde) la primera capa de lípidos (lípidos anulares) y una segunda capa de lípidos (amarillos) donde comienzan los lípidos co-solventes o 'bulk'. *Derecha*, detalle de la estructura del heterotrímero de la nitrato reductasa A (Archivo PDB 1Q16) donde se observa una molécula de fosfatidilglicerol (PG) íntimamente unida. En el detalle (*derecha, abajo*) se pueden observar las 3 subunidades NarG, NarH y NarL en amarillo, verde y naranja, respectivamente y como la molécula de PG se inserta entre las superficies de los 3 monómeros. El esquema de la derecha fue adaptado y modificado de Lee AG (83).

La presión lateral presente en las membranas contribuye también a la dependencia de la función de las proteínas de membrana con la composición de los lípidos del entorno. Ha sido demostrado que la presión lateral en las cabezas polares y en las regiones de las cadenas carbonadas deberían balancearse para obtener una estructura planar estable (15). Una proteína integral de membrana detecta un perfil de presión lateral ($\pi_{(z)}$) que se establece a través de la bicapa (86). La presión que afecta a la proteína proviene de las contribuciones de 3 fuerzas mayoritarias. Por un lado, se

observan fuerzas repulsivas entre las cabezas polares debido a interacciones electrostáticas e impedimentos estéricos (π_{cp}) y fuerzas repulsivas producidas por los límites conformacionales al empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas (π_{ch}).

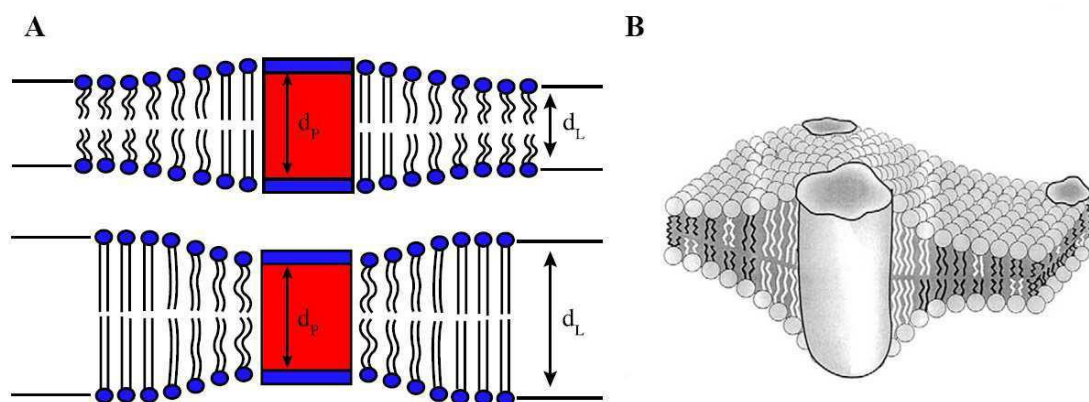


Figura 1.9: Ajuste hidrofóbico lípido-proteína. (A) Representación esquemática de una membrana y una proteína incluida en la misma. La diferencia entre el grosor del dominio transmembrana (señalada como d_p) y de la bicapa lipídica (d_L) promueven una reorganización local de la membrana para minimizar la energía del sistema (B) Representación tridimensional del fenómeno, donde una proteína selecciona su entorno hidrofóbico circundante. Adaptado de Jensen y Mourits (85).

Opuesta a esta tendencia se encuentra la tensión en la interfase entre las cadenas hidrocarbonadas y la región polar hidratada, que al buscar minimizar el área de la membrana genera una presión negativa (γ_{hfob}) (86). Al producirse cambios en la composición de fosfolípidos o en la geometría de la membrana, se altera este perfil de presión lateral y la membrana puede inducir un cambio conformacional en la proteína que module su actividad biológica, suponiendo que la proteína no sea perfectamente cilíndrica y absorba esa variación en el perfil (85,87). En este sentido, debe señalarse que la curvatura espontánea de la membrana que modificaría el perfil de presión lateral, podría no sólo modularse variando la composición de los lípidos sino también cambiando el pH, la fuerza iónica (88,89), la unión de otra proteína (90) o bien la concentración de proteína.

El ajuste hidrofóbico y el cambio en los perfiles de presión lateral no son mecanismos completamente independientes. De hecho, la pérdida de ajuste hidrofóbico produce un cambio en la tensión interfacial que puede modificar el perfil de presión lateral.

Capítulo 2

La Bomba de Calcio de Membrana Plasmática: Su función y regulación

2.1. El Ca^{2+} intracelular: Funciones generales y regulación

En términos generales, la capacidad de un organismo de recibir una señal proveniente del medio que lo circunda y de responder adecuadamente es esencial para el mantenimiento de la vida. En este contexto, el Ca^{2+} constituye una señal intracelular ubicua y versátil, que media las respuestas a estímulos extracelulares tan variados como los producidos por hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, participando de numerosos procesos celulares entre los cuales se encuentran la exocitosis, la contracción muscular, el metabolismo energético, la transcripción génica, la proliferación, el crecimiento y la muerte celular (91).

La señalización por Ca^{2+} , dada por el aumento en la concentración citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$), está comprendida básicamente por cuatro etapas. El primer paso lo constituye el estímulo del entorno que genera la señal para la movilización de Ca^{2+} ; en éste están involucrados diversos receptores de membrana incluyendo receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad tirosina quinasa, generando mensajeros intracelulares (inositol-1,4,5-trifosfato, diacilglicerol, ribosa cADP, ácido nicotínico dinucleótido fosfato, esfingosina-1-fosfato) que a su vez activan a los mecanismos de “encendido” que provocan el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (92-95). El Ca^{2+} entra al citosol desde el medio extracelular por canales dependientes de voltaje o de ligandos (96) y desde los reservorios intracelulares por el receptor de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y receptores de rianodina (97,98). El Ca^{2+} lleva adelante su función de segundo mensajero participando en diferentes procesos celulares. Finalmente, se activan los mecanismos de “apagado”, compuestos principalmente por bombas e intercambiadores: **la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA)** y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) expulsan el Ca^{2+} hacia el exterior celular, mientras que la bomba de calcio del retículo sarco-endoplásmico (SERCA) lo devuelve a este depósito intracelular; de esta manera se lleva a cabo la remoción del Ca^{2+} citoplasmático y la vuelta a la condición de reposo.

2.2. La Bomba de Calcio de Membrana Plasmática (PMCA)

La superfamilia de las ATPasas de tipo P está compuesta por un gran grupo de enzimas responsables del transporte activo de cationes a través de la membrana celular. Estas enzimas utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía y comparten la formación de un intermediario fosforilado ácido estable de tipo aspartil-fosfato durante su ciclo de reacción. Como exponentes de este grupo podemos mencionar a la Na^+/K^+ -ATPasa, la SERCA, la PMCA, la H^+ -ATPasa etc.

En particular, la PMCA está presente en la membrana plasmática de todas las células eucariotas y es uno de los sistemas que participa en la remoción del Ca^{2+} citosólico transportándolo hacia el medio extracelular. Esta función la comparte, como mencionamos previamente, con los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (NCKX). Sin embargo, a diferencia de éstos, la PMCA es un sistema de alta afinidad y baja capacidad con respecto al Ca^{2+} (99). Por ello se le atribuye principalmente el papel de regulador fino y a largo plazo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Por otro lado, hay estudios que sugieren que la PMCA contribuye en determinar la amplitud de los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ alcanzada luego de un estímulo y en contrarrestar sus aumentos transitorios (100-102), lo cual le asignaría además un papel dinámico en el control espacio-temporal de las señales de Ca^{2+} (103,104).

2.2.1. El ciclo de reacción

El modelo actualmente aceptado para explicar el funcionamiento de la Ca^{2+} -ATPasa es similar al descrito para otras P-ATPasas, tales como la SERCA y la Na^+/K^+ -ATPasa. Dicho modelo se apoya principalmente en estudios de la hidrólisis del ATP, el transporte de Ca^{2+} y la fosforilación y desfosforilación de la enzima.

Como adelantamos previamente, la PMCA transporta Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico utilizando la energía almacenada en el enlace del fosfato gamma del ATP (105). En cada ciclo de reacción, por mol de ATP hidrolizado se intercambian electrogénicamente, un mol de Ca^{2+} por mol de H^+ (106,107).

La enzima oscila entre en dos grandes estados conformacionales: E_1 y E_2 (108). Por otro lado, la bomba pertenece a la subfamilia P2 (subtipo 2B) de ATPasas de tipo P (109), las cuales se caracterizan por formar un intermediario aspartil-fosfato durante el

ciclo de reacción. En presencia de Ca^{2+} , la unión de ATP con alta afinidad conduce a la fosforilación de la bomba (estado E_1 , la bomba expone el sitio de alta afinidad por Ca^{2+} hacia el medio intracelular). Se ha demostrado que concomitantemente con la fosforilación de E_1 ($\text{E}_1\text{-P}$) se produce la oclusión de un Ca^{2+} en la enzima (110). La fosforilación por ATP de un residuo de ácido aspártico altamente conservado en la familia de las P-ATPasas, promueve un cambio conformacional y la transición $\text{E}_1\text{-P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$. El sitio de unión al Ca^{2+} en este intermediario ($\text{E}_2\text{P-Ca}^{2+}$) se encuentra expuesto hacia el medio extracelular, presenta baja afinidad por el ion y genera la liberación de Ca^{2+} con la concomitante desfosforilación del intermediario E_2P para dar E_2 . La forma E_2 , mediante un proceso acelerado por Mg^{2+} y ATP, sufre un nuevo cambio conformacional hacia E_1 que permite reiniciar el ciclo. En la **Figura 2.1** se muestra un esquema simplificado del ciclo de reacción.

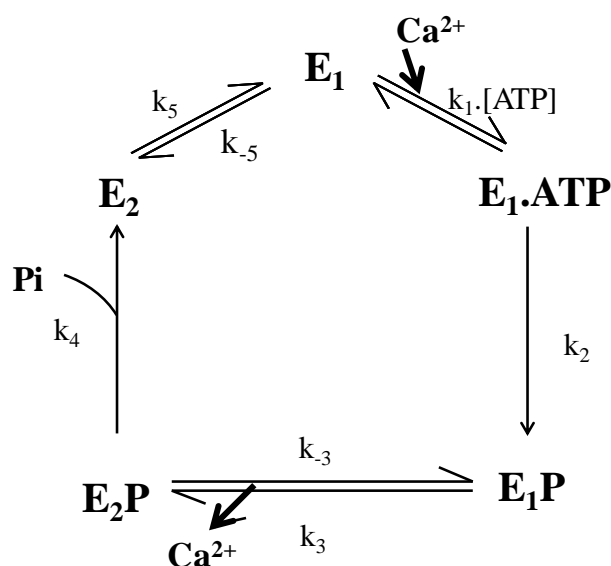


Figura 2.1: Esquema simplificado del ciclo de reacción de la PMCA. Modificado de Rega & Garrahan, (1986)(19).

La afinidad aparente de la PMCA por Ca^{2+} en condiciones basales se encuentra en el rango de 10 a 20 μM (111,112).

Por otro lado, con respecto al ATP, a partir de la observación del comportamiento bifásico de la activación por el nucleótido se ha postulado la existencia de dos sitios de diferente afinidad aparente en la enzima (113): un sitio de alta afinidad, que se conoce como el sitio catalítico, con una afinidad aparente en el orden de 25 μM y un sitio de baja afinidad con una afinidad aparente en el rango de

250 μM que se piensa tendría un papel regulatorio, favoreciendo la descomposición de la fosfoenzima (113,114).

Además del ATP, el Mg^{2+} también regula la velocidad del ciclo de reacción de la PMCA, en este caso favoreciendo la desfosforilación de la bomba al promover la transición $\text{E}_1\text{-P} \rightarrow \text{E}_2\text{-P}$. Aunque el paso de fosforilación en presencia de Ca^{2+} puede ocurrir aún en ausencia de Mg^{2+} (115), su presencia acelera la reacción (116,117), y lleva a un aumento de los niveles de fosfoenzima en el estado estacionario. Por otro lado, fue descrito que el Mg^{2+} , al igual que el ATP, también influye en el proceso de desfosforilación de la bomba, aunque se cree que ambos actúan en pasos diferentes(116).

2.2.2. Estructura

A la fecha, no se cuenta con la estructura tridimensional de ninguna de las isoformas de la PMCA. Aunque su secuencia completa se conoce hace alrededor de 28 años (118,119) existen varios factores que dificultan la resolución de su estructura mediante métodos cristalográficos. Por un lado, con respecto a la obtención desde fuentes naturales, se encuentra en baja concentración en las membranas biológicas (representa menos del 0.1% de las proteínas totales de membrana,(120)). Por otro, la gran variedad de isoformas dificultan la obtención de muestras homogéneas que permitan la formación de cristales (121). Si bien las técnicas de biología molecular permitieron la sobreexpresión de varias isoformas de la PMCA en diversos sistemas celulares como *S. cerevisiae*, células COS y células de insecto (Sf9) (110,122,123), no se ha podido obtener, luego de un proceso de purificación, cristales aptos para ser sometidos a la difracción de rayos X. En términos de estructura tridimensional, se ha obtenido reciente la estructura del dominio de unión a CaM de la PMCA correspondiente a *A. thaliana*, en presencia y ausencia de la misma, mediante cristalografía de rayos X (124). Por ello, la información que actualmente se tiene acerca de su estructura tridimensional se basa en el modelado molecular por comparación con otras P-ATPasas, en especial con la SERCA. Sin embargo, de ésta difiere por la presencia hacia el C-terminal de una región compuesta por entre 85 a 120

aminoácidos, según la isoforma, que constituye la región reguladora de la PMCA y la que le confiere la sensibilidad a CaM (122).

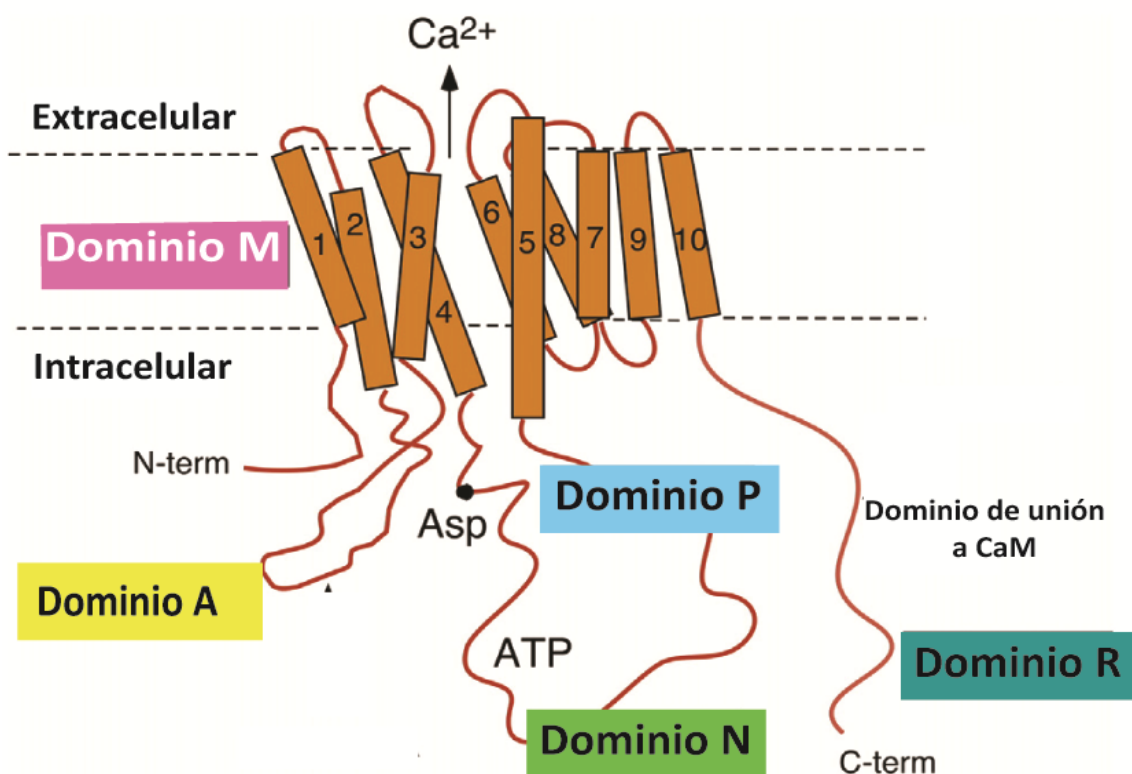


Figura 2.2. Representación esquemática de la estructura de la PMCA. Las regiones transmembrana están numeradas y constituyen el dominio M. Los extremos N y C terminal (intracelulares) están marcados. También se indican el residuo Asp que forma el intermediario fosforilado en el ciclo de reacción, la región de unión al ATP (ATP) y el dominio de unión a CaM. Se indica con una flecha la dirección del transporte activo de Ca^{2+} . Se muestran los principales dominios citosólicos: A (*actuator*), P (fosforilación), N (unión a nucleótido) y R (regulatorio). Adaptada de Strehler(125).

El tamaño de las isoformas de PMCA existentes varía entre 1115 a 1258 aminoácidos, lo que corresponde a una única cadena polipeptídica con una masa molecular comprendida en un rango de 120 – 140 kDa. Se propone la existencia de 10 segmentos transmembrana y 4 dominios principales, todos ellos citosólicos, al igual que los extremos N y C terminales; del lado extracelular sólo hay presentes pequeños bucles que interconectan los segmentos transmembrana entre sí, como se observa en la **Figura 2.2**. Los dominios citosólicos comprenden al dominio A (de *actuator*, dominio catalítico), al dominio P (de *phosphorylation*, donde se encuentra el residuo de ácido aspártico sujeto a fosforilación), al dominio N (de *nucleotide-binding*, donde se une el ATP) y al C-terminal donde se encuentra el dominio de unión a CaM (CaM-BD),(126).

2.2.3. Isoformas y variantes de empalme alternativo de la PMCA

En mamíferos, existen 4 genes distintos (ATP2B1-4) que se encuentran ubicados en diferentes cromosomas: PMCA1 en 12q21-23, PMCA2 en 3p25.3, PMCA3 en Xq28 y PMCA4 en 1q25-q32 (que codifican para las cuatro isoformas de la bomba, PMCA1, 2, 3 y 4, numeradas de acuerdo al orden de su descubrimiento (121).

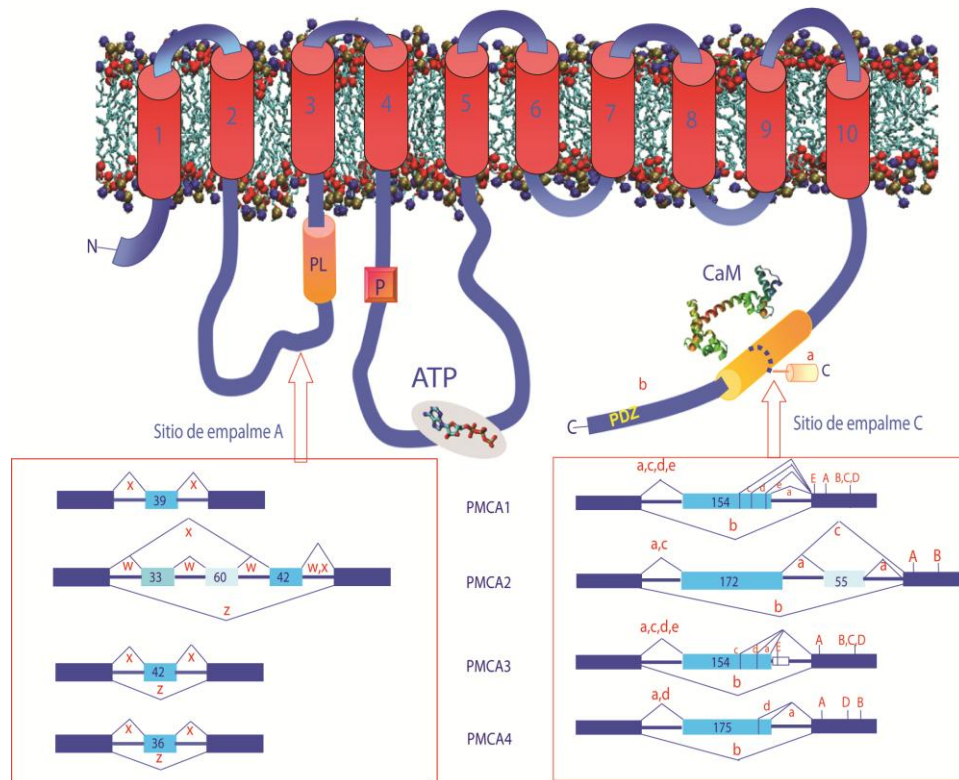


Figura 2.3: Dominios topológicos y variantes de empalme alternativo de las isoformas de la PMCA en humanos. Los 10 dominios transmembrana están numerados y se representan con los cilindros rojos. Los sitios de empalme "A" (en el primer *loop* citosólico) y "C" (en la cola C-terminal) están señalados con flechas rojas. El sitio de empalme "C" se encuentra en el dominio de unión a CaM (cilindro amarillo, definido por el modelo estructural de CaM). Se muestra la estructura de los exones de las diferentes regiones afectadas por el empalme alternativo en los 4 genes de PMCA. Los exones constitutivos se indican como rectángulos azules, los exones insertos alternativamente se muestran en celeste; las variantes de empalme resultantes se simbolizan con letras en minúscula, las posiciones de los codones *stop* para variante de empalme se indican con letras mayúsculas. En la PMCA3, la variante de empalme "e" resulta de un "read-through" del exón 154-nt en el intrón siguiente (indicado como un pequeño rectángulo blanco). Los tamaños de los exones empalmados alternativamente se representan como números de nucleótidos. PL= dominio de unión a fosfolípidos; P= residuo de aspártico fosforilable; PDZ= dominio PSD-95/1, Dlg/ZO-1. Imagen adaptada y modificada de Krebs (127).

Diversos procesos de empalme alternativo de los transcritos primarios en dos sitios diferentes generan más de 20 variantes. El sitio de empalme A cambia la longitud del primer *loop* intracelular (Dominio A), sitio nominal de unión a proteína G y sensible

a fosfolípidos ácidos mientras que el sitio de empalme C altera la longitud del segmento C-terminal promoviendo diferentes características con respecto a la regulación y tráfico a dichas variantes (**Figura 2.3**).

En la **Tabla 2.1** encontramos las principales variantes de la PMCA en seres humanos, con el número de aminoácidos (aa) que las componen y los principales sitios donde se expresan. Como adelantamos, las diferentes isoformas de la PMCA y sus respectivas variantes de empalme se diferencian por sus distintas propiedades a nivel de la regulación y función. Una de las diferencias más notables está relacionada con la regulación (activación) por CaM, que se une al segmento C-terminal de las PMCA liberándola de las interacciones autoinhibitorias que presenta el segmento C con el dominio catalítico (128,129). El empalme alternativo en el sitio C impacta en la afinidad de las bombas por el complejo Ca^{2+} -CaM como también en el grado y cinética de la activación (130,131). En general, las variantes "a" con un segmento C terminal más corto muestran menor afinidad por CaM pero mayor actividad basal y una estimulación por CaM más modesta que las variantes "b" (125). Estas diferencias pronunciadas en la actividad basal y en el grado de activación por CaM también existen entre las variantes "b" de las isoformas de PMCA, particularmente entre la PMCA4b y la PMCA2b: PMCA 4b presenta un actividad basal menor y gran activación por CaM, mientras que la PMCA2b presenta una mayor actividad basal y una activación por CaM mucho más modesta (132). Las distintas cinéticas de activación y desactivación por CaM de las isoformas de PMCA y sus variantes resultan en la existencia de varias "memorias" en cada bomba de activaciones previas, esto podría derivar en diferentes reacciones de las bombas ante los picos intermitentes de Ca^{2+} y afectar la velocidad de recuperación de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (133,134). Además, las diferencias en la secuencia de aminoácidos en el segmento C terminal afectan la regulación por fosforilación que presenta la PMCA (por ejemplo por PKA, PKC o tirosina kinasas como src), oligomerización y otras interacciones proteína-proteína (100,126,135,136).

Por otro lado, las diferencias en el dominio A serían las responsables de las diferencias en la regulación de las isoformas de la PMCA por lípidos y, en particular, por fosfolípidos ácidos (137-139).

La multiplicidad de isoformas, así como su localización tejido-específica y regulación, responden a la necesidad de un control particular sobre el transporte de Ca^{2+} en los diferentes tejidos y condiciones fisiológicas.

Tabla 2.1
Expresión de las diferentes isoformas de la PMCA en tejidos humanos adultos. Adaptada de Strehler (125).

Isoformas	Distribución	Tamaño (aa)	Sitios con mayor expresión
PMCA 1	x/a	1176	Cerebro
	x/b	1220	Ubicua; pulmón; intestino; riñón
	x/c	1249	Músculo esquelético; corazón
	x/d	1258	Músculo esquelético
	x/e	1171	Cerebro
PMCA 2	w/a	1199	Cerebro; células pilosas cocleares externas
	x/a	1168	Cerebro; terminales presinápticas del hipocampo
	z/a	1154	Cerebro; tejido excitable
	w/b	1243	Cerebro; tejido mamario en lactancia; células β pancreáticas
	x/b	1212	Cerebro; células cerebelares de Purkinje
	z/b	1198	Cerebro; tejido excitable
PMCA 3	x/a	1173	Cerebro; médula espinal
	z/a	1159	Cerebro; células beta del páncreas
	x/b	1220	Cerebro; glándula adrenal; músculo esquelético
	z/b	1206	Cerebro
PMCA 4	x/a	1170	Músculo liso; vejiga; útero; corazón
	z/a	1158	Músculo liso; corazón
	x/b	1205	Ubicua; corazón; riñón
	z/b	1193	Corazón
	x/d	1241	Corazón
	z/d	1229	Corazón
	x/e	1164	Cerebro; vejiga
	z/e	1152	Cerebro; vejiga

. Por ejemplo, la PMCA2 a diferencia de las demás isoformas tiene una alta actividad basal, esto es aún en ausencia de activadores, lo que le permite tener en todo momento una actividad de transporte eficiente lo cual resulta de especial importancia en células especializadas como las células ciliadas del oído interno (140). De la misma manera, en la glándula mamaria durante el periodo de lactancia hay una menor expresión de la PMCA4, la cual se reemplaza por una mayor expresión de la PMCA2, relacionado con el enriquecimiento de Ca^{2+} en la leche materna (141). Por

otro lado, la ubicuidad de expresión de la PMCA1 y la PMCA4 está relacionada con la característica constitutiva (*housekeeping*) de estas isoformas.

Al margen de esto, estudios recientes a nivel celular, de órganos completos o en animales modificados genéticamente han emancipado a las PMCAs de su rol de simples “guardianes” de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ y las han propuesto como partícipes de procesos complejos de señalización de Ca^{2+} y de flujos vectoriales de Ca^{2+} altamente regulados (125). Estas observaciones van en sentido opuesto al concepto de una función y expresión inmutables como requisito para definir una enzima *housekeeping* (142).

2.2.4. Regulación de la actividad de las PMCAs

2.2.4.1. Mecanismos que aumentan la actividad de las PMCAs

En condiciones basales, las PMCAs poseen baja afinidad por Ca^{2+} ($K_{0,5} = 10-20 \mu M$) (111,112), por lo que se considera que bajo estas condiciones, donde la $[Ca^{2+}]_{cit}$, libre es ~ 100 nM, la actividad de la bomba es prácticamente nula (excepto para la PMCA2). Por ello, los mecanismos que aumentan su actividad, ya sea a través del aumento en la afinidad aparente por Ca^{2+} como en la actividad máxima de la enzima (V_{max}), resultan cruciales.

2.2.4.2. Activación por calmodulina

Como se mencionó en la Sección 2.2.2, el dominio CaM-BD de la bomba interacciona intramolecularmente con otras dos regiones de la enzima (sitio receptor) generando una conformación autoinhibida. Cuando el complejo Ca^{2+} -CaM se une al dominio CaM-BD, desplaza a éste del sitio receptor, llevando a un estado activado de la bomba. La unión del complejo Ca^{2+} -CaM estimula la actividad de la bomba aumentando la afinidad aparente por Ca^{2+} y la V_{max} , siendo la primera el efecto predominante (111). La PMCA2b es la isoforma que presenta mayor afinidad por CaM ($K_d \sim 2$ nM), seguida por la PMCA4b ($K_d \sim 5-10$ nM).

2.2.4.3. Activación por fosfolípidos ácidos

La actividad de las PMCA, cómo ha sido descripto para otras proteínas de membrana, se encuentra afectada por la composición lipídica de su entorno. Las primeras evidencias de la modulación de la actividad ATPasa por fosfolípidos ácidos se remontan a los resultados presentados por Ronner y col. en 1977 (143), quienes utilizaron membranas de glóbulos rojos parcialmente desprovistas de fosfolípidos mediante un tratamiento con fosfolipasa A₂ y encontraron que la actividad de la Ca²⁺-ATPasa podía ser reactivada por la adición de fosfolípidos ácidos o ácidos grasos insaturados. Años después Niggli y col. (111), mediante el uso de membranas de eritrocitos y PMCA purificada a partir de esta misma fuente, estudiaron el aumento de la proporción de fosfatidilserina en el entorno de la proteína. Se estimó que la concentración de fosfatidilserina en la membrana plasmática cercana a la bomba es tal que podría producir la mitad de la activación máxima de la enzima (111). Posteriormente, los estudios sobre este fenómeno se abocaron a hallar los posibles sitios de unión mediante los cuales los fosfolípidos ácidos ejercían su acción activadora sobre la PMCA. Mediante experimentos de proteólisis controlada (144,145) y de unión a distintos péptidos (146,147) se identificó una región de unión a lípidos ácidos, llamada región AL, cercana al segmento transmembrana M3. Esta secuencia presenta 8 residuos candidatos que, si se exponen, pueden brindar sus cadenas laterales cargadas positivamente para la interacción electrostática con estos lípidos. Estudios más recientes muestran que deleciones y/o mutaciones en esta zona –o cerca de ella– activan a la bomba de la misma manera que los lípidos ácidos (123,148,149).

El efecto activador de los fosfolípidos ácidos es aún más pronunciado que el de la CaM; éstos pueden llegar a aumentar la afinidad aparente de la bomba por Ca²⁺ hasta un valor de K_{0,5} ~ 100 nM. Los principales exponentes de este grupo serían fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidil inositol trifosfato y bifosfato (IP₃ y PtdIns(4,5)P₂) (112,150). En comparación con otros fosfolípidos ácidos, se requieren menores concentraciones de PtdIns(4,5)P₂ para activar a la PMCA (138,151,152). En este sentido, Penniston y col. muestran que las PMCA (en particular, PMCA 2wb y 4b) funcionan como protectoras de los *pools* de PtdIns(4,5)P₂ protegiéndolos de la agotamiento excesivo por la fosfolipasa C (150). En este mismo trabajo los autores revelan, mediante simulaciones de dinámica molecular de un modelo de la PMCA, una región de cadenas laterales de aminoácidos cargadas positivamente que parecen

interactuar más fuertemente con $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que la región AL previamente propuesta. En contraposición con la región AL, que es una secuencia de 25 aminoácidos que se encuentran contiguos en la secuencia primaria de la proteína, esta región se compone de varios grupos de residuos (lisinas y argininas) pertenecientes a diferentes regiones tipo tallo (*stalk*) cercanas a la interfase formando un *collar*. Es notable que estas zonas son muy conservadas entre las PMCA de distintos organismos y no están presentes en la SERCA, la cual no es activada por fosfolípidos ácidos (150).

2.2.4.4. Activación por ácidos grasos insaturados

Al igual que la modulación por fosfolípidos ácidos, la activación de las PMCA por ácidos grasos insaturados (AGI) de cadena larga fue documentada Niggli y col. en 1981. Estos autores ensayaron el efecto de concentraciones crecientes de ácido oleico o linoleico mediante el uso de membranas de eritrocitos humanos y PMCA purificada reconstituída en diferentes sistemas fosfolipídicos. Las concentraciones que causaron la máxima activación se encontraban alrededor de 10 nmoles de ácido por μg de enzima y superadas estas concentraciones, se observó un rápido descenso de la actividad Ca^{2+} -ATPasa. En este sentido, Sarkadi y col. (153) presentaron evidencias que indicaban que los productos de digestión de la fosfolipasa A2, lisofosfatidilcolina y ácido oleico, aumentan la velocidad de la bomba de calcio presente vesículas invertidas de glóbulos rojos depletadas de CaM, describiendo también esta conducta bifásica. En contraposición con éstos resultados, Davis y col. (154) describieron una respuesta inhibitoria de la actividad Ca^{2+} -ATPasa ante concentraciones crecientes de ácido oleico.

Se realizaron también estudios en células intactas que demostraron que otro exponente del grupo de los AGI, el ácido araquidónico, promovía la extrusión de Ca^{2+} intracelular en macrófagos activados a expensas de la activación de la PMCA (155). Si bien el mecanismo de acción de los AGI aún no ha sido completamente entendido, se ha descrito que tanto el ácido oleico como el linoleico y el araquidónico, provocan un aumento de la afinidad aparente por el calcio y que este efecto sería independiente de la presencia de calmodulina o fosfolípidos ácidos (68,156). Por otro lado, estos autores también demostraron que el efecto activador del ácido araquidónico es específico para

la PMCA4 ya que, cuando se ensayó el efecto en membranas de cerebro que acumulan PMCA2 y 3, sólo se observó un efecto inhibitorio en todo el rango de concentración ensayado. La modulación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de las PMCAs por AGI ha sido menos estudiada que el efecto de los fosfolípidos ácidos. Probablemente esto se deba a que los AGI ejercen un efecto de menor magnitud activadora que los fosfolípidos ácidos.

La presencia de AGI libres en la membrana en el entorno inmediato de la proteína, sería factible en diversos momentos de la célula ante el transcurso de una cascada de señalización, ya que se ha demostrado ampliamente su potencial como segundos mensajeros (157). En este sentido, se ha propuesto que la inhibición por AGI de 18 carbonos de las respuestas proinflamatorias de los neutrófilos humanos se ejerce –al menos en parte- a través de la modulación positiva de la actividad de las PMCAs presentes en este tipo celular (158).

2.2.4.5. Activación por fosforilación

Además del residuo aspartato fosforilable, la PMCA puede ser fosforilada en residuos serina/treonina y tirosina. En particular, el dominio C-terminal de la bomba es particularmente rico en treoninas y serinas.

La proteína quinasa A (PKA) fosforila la serina dentro de la secuencia consenso KRNSS, que sólo se encuentra presente en la isoforma 1 de la bomba, localizada luego del dominio CaM-D hacia el C-terminal. La fosforilación en este sitio aumenta tanto la afinidad de la bomba por Ca^{2+} como la V_{max} de la enzima (159).

El efecto y el sitio de la fosforilación de la PMCA por la proteína quinasa C (PKC) depende considerablemente de la isoforma y la variante de empalme alternativo de que se trate. Se ha observado que las PMCA2a, 3a, 4a y 4b se fosforilan fácilmente mientras que las isoformas 2b y 3b de la bomba son sustratos muy pobres de la PKC. Mientras que la fosforilación de la PMCA4b aumenta parcialmente la actividad basal de la bomba por colaborar en la disociación del dominio autoinhibitorio del sitio receptor, sin influir en la unión del complejo Ca^{2+} -CaM (160), la actividad basal de las variantes α no se afecta por la fosforilación. En las isoformas 2a y 3a, pero no en la 4a, esto lleva además a la pérdida de la estimulación por Ca^{2+} -CaM (144,161).

A diferencia de la fosforilación en serina/treonina, la fosforilación de una tirosina inhibe la actividad de la bomba (162), como se ha observado en la PMCA4b durante la activación plaquetaria.

2.2.4.6. Activación por proteólisis

Las primeras evidencias de un efecto activador por proteólisis parcial de la bomba tienen su origen en los trabajos de Stieger y Schatzmann (163), en los que se observó que el tratamiento de la PMCA purificada con tripsina producía la pérdida progresiva de la activación por Ca^{2+} -CaM volviéndose constitutivamente activa. Se vio que esto se relaciona con la pérdida secuencial de porciones cada vez mayores del extremo C-terminal, es decir, cuando se va perdiendo el dominio CaM-BD y la autoinhibición de la bomba (145).

A nivel celular, y de posible relevancia fisiológica, el clivado del extremo C-terminal se observó con una proteasa intracelular, la calpaína (164), y durante el proceso de apoptosis por la acción de la caspasa-3 (165). La primera activa la bomba a través de la formación de un fragmento de 124 kDa, el cual es el producto de dos pasos sucesivos de proteólisis en el extremo C-terminal. La segunda cliva a la PMCA4b en el residuo inmediatamente posterior al Asp1080 produciendo una enzima de 120 kDa, constitutivamente activa y poco sensible a CaM.

2.2.4.7. Activación por dimerización/oligomerización

Se ha visto que tanto en membranas biológicas (166,167) como en sistemas aislados (168), la PMCA puede asociarse entre sí pasando de una forma sensible a la activación por CaM, situación que se presenta a bajas concentraciones de la bomba (~ 15 nM), a un estado activado insensible a la activación por CaM a altas concentraciones de la enzima (~ 75 nM). Aunque se argumentó que estas concentraciones de enzima son mucho mayores a las esperadas en membranas nativas, hay estudios que demuestran que la PMCA se localiza en caveolas donde su concentración puede ser 18-25 veces más alta que en las otras regiones de la membrana (169). Se ha observado que CaM inhibe el proceso de oligomerización, aunque puede unirse a la enzima ya oligomerizada. Se ha sugerido que el dominio

CaM-BD media la asociación de las moléculas de la bomba entre sí (170) en proceso que requiere la presencia de Ca^{2+} en concentraciones nanomolares (171) situación compatible con el medio intracelular, aún en situación de reposo.

2.2.4.8. *Mecanismos que inhiben la actividad de la PMCA*

La PMCA, al igual que todas las P-ATPasas, se inhibe por ortovanadato ($[\text{VO}_4(\text{OH})]^{2-}$) y lantano (La^{III}). Uno de los puntos más salientes con respecto a la complejidad del estudio *in-vivo* de las PMCA es la falta de inhibidores específicos de esta familia. En este sentido, Chaudhary y col. publicaron en el año 2001 el diseño de una familia de péptidos, las caloxinas, que inhibirían a la PMCA de manera específica, pero con muy baja afinidad (aproximadamente con K_i de 500 μM) (172), por lo que los estudios que hay realizados con ellos son escasos.

Hasta la fecha, sólo se ha descrito a un péptido (caloxina 1b3) como el único inhibidor relativamente selectivo de la PMCA, en particular de la PMCA1 (173). Se demostró que este péptido es selectivo en la inhibición de la PMCA1 en la mucosa duodenal de conejo y en células endoteliales de arteria coronaria de cerdo.

Por otro lado, se ha observado que la eosina, y su carboxi derivado, tienen cierta selectividad en la inhibición de la PMCA según la concentración en la que se utilicen, pero se espera que esta no sea muy importante ya que su mecanismo de acción se basa en la interferencia con la unión del ATP a su sitio, el que se encuentra altamente conservado entre las P-ATPasas. Hay escasa literatura con respecto a la especificidad de la inhibición siendo uno de los trabajos más significativos al respecto el de Gatto y col. (174) en el que se describe la inhibición de la PMCA cardíaca por eosina ($\text{IC}_{50} \sim 1\mu\text{M}$) y muestra que su utilización a concentraciones $\leq 20\mu\text{M}$ no inhibe al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

El ortovanadato, el cual a pH fisiológico está presente como $[\text{VO}_4(\text{OH})]^{2-}$, análogo estructural del fosfato (PO_4^{3-}), es un inhibidor clásico de las bombas de tipo P que se une al residuo de ácido aspártico que se fosforila durante el ciclo de reacción. La potencia del vanadato como inhibidor depende de la composición iónica del medio, siendo mayor en presencia de K^+ , Na^+ y Mg^{2+} ($K_i = 2 - 3\mu\text{M}$). Actúa como un inhibidor no competitivo con respecto al sitio de alta afinidad para el ATP, pero sería

parcialmente competitivo en el sitio de baja afinidad. Se piensa que se une a la conformación E_2 de la bomba y que bloquea la transición $E_2 \rightarrow E_1$.

Al igual que el resto de las P-ATPasas, las PMCA también pueden ser inhibidas por La^{III} , pero a diferencia de lo que sucede con el resto de ellas, éstas presentan la particularidad de que su inhibición por La^{III} va acompañada de un aumento máximo en el nivel del estado estacionario del intermediario fosforilado mientras que en las demás bombas se encuentra significativamente disminuido (175,176).

Otros inhibidores no específicos de la PMCA reportados son: el rojo de rutenio, la quercetina, la suramina sódica, la vinblastina, el ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) y el N-(4-azido-2-nitrofenil)-2-aminoetilsulfonato (NAP-aurina).

Recientemente se identificó al ácido aurintricarboxílico (ATA) como un nuevo inhibidor de la PMCA4 capaz de inhibir completamente a ésta isoforma a concentraciones de 1 μM (177). Estudios in vitro demostraron que este compuesto presenta un efecto dosis dependiente sobre la PMCA4 (IC_{50} 150 nm aprox.), un efecto muy minoritario sobre la PMCA1 y SERCA y no presenta efecto sobre la $Na^+ K^+$ ATPasa. Si bien podría ser un compuesto útil para estudiar procesos que involucren a la PMCA4, ATA también modula una variedad de procesos celulares diferentes: actúa como inhibidor de nucleasas (178), inhibidor de la glutamato deshidrogenasa (179) y bloquea la síntesis de micro RNA (180).

2.2.4.9. Inhibidores fisiológicos de la PMCA

Hasta el momento se han descrito sólo dos ligandos endógenos que por interacción directa con la PMCA inhiben su actividad.

Uno de ellos es el péptido 14 -3-3 ϵ (181). Este pertenece a una familia de pequeñas proteínas de carácter ácido involucradas en diversas vías de señalización y halladas solamente en organismos eucariotas. Se ha observado que interactúa específicamente con la PMCA4 y que al unirse a su extremo N-terminal inhibe la actividad de la bomba.

El otro inhibidor descrito es la tubulina acetilada asociada a la membrana plasmática (182). Se ha observado que su unión a la PMCA inhibe la actividad de transporte de la bomba. La disociación del complejo PMCA/tubulina-acetilada puede

ser inducida por etanol y por CaM, lo que resulta en la restitución de la actividad de la enzima.

2.2.5. *Patologías relacionadas con defectos de las PMCA*s

A lo largo de los años, se ha demostrado que las diferentes PMCA^s están implicadas en un número de patologías específicas, íntimamente relacionadas con la especialización funcional de cada isoforma en el control de los diferentes eventos celulares mediados por Ca^{2+} . La existencia de patologías diferenciales concuerda con los diferentes patrones de expresión de las PMCA^s, propiedades funcionales diversas y diferentes proteínas que interactúan con cada isoforma.

Gran parte del conocimiento referido al papel 'global' previamente mencionado de cada isoforma de la PMCA se obtuvo mediante estudios en ratones *knockout*. En particular, mediante esta estrategia se demostró la importancia de la PMCA1 (ubícua) en el desarrollo de órganos y tejidos, revelando que la pérdida homocigota de ésa isoforma no es compatible con un desarrollo embrionario normal (183). Además, se ha demostrado que mutaciones en el gen ATP2B1 que resultan en pérdida de la expresión o función podrían causar patologías específicas. Por ejemplo, estudios de asociación de genoma completo (*genome wide association*) en grandes poblaciones humanas con ascendencia asiática, europea y africana demostraron que una asociación altamente significativa entre la presencia de SNPs específicos en el locus ATP2B1 con un aumento de la presión arterial sistólica y el riesgo cardiovascular (184,185). Si bien el mecanismo fisiopatológico de esta asociación aún no está claro, probablemente esté relacionado con una disminución del nivel de la PMCA1 y un déficit consecuente del manejo de las concentraciones de Ca^{2+} en el músculo liso vascular: Cuando se suprime a la PMCA1 en el músculo liso vascular de un ratón *knockout* condicional, se observa un aumento de la presión arterial (186). Interesantemente, el rol de la PMCA4 en la hipertensión arterial se encuentra aún menos claro si bien se sabe que tanto la sobreexpresión de la PMCA4 como la inhibición aumentan la contractilidad arterial, aumentando así la presión (187).

Con respecto a la PMCA2, en particular la variante w/a, la cual se expresa selectivamente en las estereocilias del oído interno, se ha demostrado que juega un rol

fundamental en mantener la homeostasis de Ca^{2+} en dichas células. Por lo tanto, no es extraño que la pérdida de función de la PMCA2 resulte en la generación de sordera, tal y como ha sido demostrado en ratones que también presentaron dificultades en el mantenimiento del balance (188).

La PMCA3 al igual que la PMCA2, está principalmente restringida al sistema nervioso central, en terminales pre-sinápticas y por otro lado, también ha sido hallada en músculo esquelético (189). Aunque los descubrimientos que existen hasta el momento con respecto a la especificidad, manejo del Ca^{2+} y funciones de las isoformas de empalme alternativo de la PMCA3 son escasos, se ha demostrado recientemente la presencia de mutaciones en el gen de la PMCA3 en pacientes con determinadas patologías. En un estudio clínico extensivo de pacientes con adenomas productores del aldosterona (APA), que derivan en hipertensión secundaria, se determinó que debido a mutaciones somáticas en el gen ATP1A1 ($\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPasa) y ATP2B3 (PMCA3) en varios de ellos, la homeostasis iónica de estas células se encontraba afectada (190,191). En este estudio los autores identificaron dos mutantes de delección de la PMCA3 en el dominio transmembrana M4 (V426, V427/L425, V426) íntimamente relacionado con el sitio de unión a Ca^{2+} . En otro estudio, llevado a cabo por Zanni y col. (192), se halló una mutación con pérdida de sentido (*missense*) de la PMCA3 en una familia con ataxia cerebelar congénita. La mutación identificada G1107D está ubicada en el dominio de unión a CaM. Los autores sobreexpresaron la forma mutada de la bomba en fibroblastos humanos y, en comparación con controles, hallaron que dicha forma mutada tenía una actividad casi nula.

Con respecto a la PMCA4, además del posible rol en la hipertensión, la falta de dicha enzima ha sido asociada principalmente con el desarrollo de infertilidad masculina (183,193). Por otro lado, un estudio muy reciente identificó una mutación con pérdida de sentido (R268Q) en la PMCA4 y la proponen como causante de la paraplegia espástica familiar autosómica dominante hallada en una familia China (194).

En la **Tabla 2.2** se mencionan a modo de resumen las diferentes patologías asociadas a las PMCA.

Tabla 2.2

Resumen de la distribución de las isoformas de la PMCA y su relación con diferentes patologías adultos. Adaptada de Krebs (127).

PMCA	Ubicación	Destino	Knock-out	Mutación	Patología
1	<i>Ubicua</i>		Letal		
2 2w 2w/a 2w/b	<i>Neural</i>	<i>Postsináptica</i> <i>Apical</i> <i>Estereocilias</i> <i>Gland. Mamaria</i>	Sordera, desbalance	G283S, G293S	Sordera en ratones Sordera en hombres
3 3 3	<i>Neural,</i> <i>musc.esquelético</i>	<i>Presináptica</i>		V426, 427/IA25, V426 G1107D	APA Ataxia
4 4b	<i>Ubicua</i>		Infertilidad masculina	R268Q	FSP

Abreviaturas: APA= adenomas productores de aldosterona; FSP= paraplegia espástica familiar

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Capítulo 3

Hipótesis y objetivos

1. Relevancia del problema

Las proteínas integrales de membrana funcionan insertas en la bicapa lipídica circundante por lo que la composición de dicha bicapa debe proporcionar un entorno adecuado para su funcionamiento. El efecto de la estructura de los lípidos sobre la función de las proteínas de membrana puede ser descrito en términos moleculares: interacciones moleculares entre el lípido y la proteína como a través del efecto hidrofóbico, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas, etc. Por otra parte podría ser descrito en términos físicos: cambios de las propiedades físicas de la bicapa lipídica, como la fluidez, la tensión de la membrana y otras propiedades relacionadas (15). En los últimos años, la cristalografía de rayos X ha tenido éxito en la resolución de estructuras de un número limitado de proteínas de membrana que revelaron interacciones específicas con los lípidos del entorno (195-197). Sin embargo, aún existen numerosas estructuras de proteínas integrales, como la PMCA, de las que se cuenta con escasa información acerca de la relación entre la estructura y la función.

El desarrollo de esta tesis doctoral está dirigido a investigar las interacciones existentes entre la PMCA y su entorno lipídico. En particular, estudiaremos la modulación de la misma por los fosfolípidos del entorno y los ácidos grasos insaturados, con el objetivo general de postular un modelo que permita comprender los mecanismos que subyacen a dichas interacciones.

2. Hipótesis

Según análisis de secuencias genómicas, el 30% de las proteínas generadas por el *Homo sapiens* son proteínas integrales de membrana (198). Sin embargo, existen muy pocas estructuras tridimensionales que correspondan a proteínas de este tipo. Podríamos citar algunas razones por las que se dificulta su estudio:

- Son de difícil obtención dada su baja concentración en las membranas biológicas y además, como generalmente presentan

modificaciones post traduccionales, resulta complejo sobreexpresarlas en bacterias.

- Las múltiples técnicas disponibles hasta la fecha para el estudio de proteínas, su estructura e interacciones (RMN, Cristalografía de Rayos X, Dicroísmo circular, etc.) son preferentemente útiles para proteínas de tipo soluble. Se utilizaron en proteínas de membrana, pero el proceso se torna particularmente complejo y dificultoso.

- Al ser insolubles en un medio acuoso, se necesita reconstituir este tipo de proteínas en entornos hidrofóbicos, que difieren según la proteína en estudio.

Resulta indispensable para cualquier investigación que se desee encarar con una proteína integral de membrana, el manejo de esta última variable. El entorno lipídico de una proteína de membrana influye directamente sobre su estructura y su función (83), por lo que es crucial la elección de un sistema adecuado de reconstitución.

La mayoría de las evidencias estructurales y cinéticas obtenidas para la PMCA fueron relacionadas con las descritas para la SERCA de músculo esquelético, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta en varias de sus conformaciones. Sin embargo, a pesar de pertenecer a la misma familia de P-ATPasas y en consecuencia tener una alta similitud, existen grandes diferencias entre ambas: la PMCA posee un dominio C-terminal autoinhibitorio que se encuentra ausente en la SERCA y a diferencia de ésta es activada por fosfolípidos ácidos y ácidos grasos insaturados (entre otros activadores) (111,112).

En el presente estudio, utilizaremos a la PMCA como modelo de proteína de membrana y su utilización nos permitirá explorar las interacciones lípido-proteína que modulan la actividad de transporte de Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos en los distintos sistemas de reconstitución nos permitirán plantear una hipótesis que relacione el aspecto biofísico del sistema con la estructura y los procesos bioquímicos previamente estudiados.

Como mencionamos en el Capítulo 2, la Bomba de Calcio de la Membrana Plasmática (PMCA) es una proteína integral de membrana que presenta 10 segmentos transmembrana de la cual no se cuenta con información estructural a nivel

tridimensional. Además, pocos estudios han sido llevados a cabo con el fin de dilucidar la compleja relación que guarda con los lípidos del entorno.

Recientemente hemos demostrado mediante la utilización de un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina (TID-PC/16), que las P-ATPasas presentan una exposición diferente del dominio transmembrana a los lípidos del entorno, según la conformación en la cual se encuentre (67,68). Como mencionamos, a diferencia de la SERCA y la Na,K-ATPasa, la PMCA es regulada por calmodulina, fosfolípidos ácidos y ácidos grasos insaturados (144). Esta última modulación ha sido menos estudiada. Considerando que los ácidos grasos insaturados están involucrados en numerosos procesos celulares y tienen un efecto directo sobre la estructura y cinética de la PMCA, proponemos identificar los sitios de interacción. Para esto utilizaremos un análogo fotoactivable del ácido oleico e intentaremos hallar la ubicación del/los sitio(s) de interacción mediante análisis por espectrometría de masas. La sonda fotoactivable AS86 (199) se une covalentemente a la PMCA y es desplazable por ácido oleico.

3. Objetivos generales

La presente tesis doctoral se basa en el estudio de las complejas interacciones lípido-proteína, características de las proteínas de membrana, utilizando a la PMCA como modelo. Por estas razones, el trabajo propone:

1- Exponer a la PMCA frente a distintos sistemas de reconstitución para relacionar la actividad de transporte de calcio con la matriz lipídica que rodea los segmentos transmembrana de la bomba. Esto permitirá proponer un modelo de la interacción de la PMCA con su entorno lipídico.

2- Sintetizar y utilizar un análogo fotoactivable de ácido oleico con el objetivo de hallar el/los sitio(s) específico(s) de unión para los ácidos grasos insaturados que son moduladores positivos de la PMCA (111) así como fue propuesto para los fosfolípidos ácidos, unos de los principales activadores de la PMCA (112) junto con calmodulina (CaM).

4. Objetivos específicos

Para la concreción de estos objetivos principales, se plantean los siguientes objetivos parciales como estrategia de trabajo:

- Reconstituir a la PMCA en micelas mixtas compuestas por distintos fosfolípidos y por el detergente utilizado en la extracción de la enzima, C₁₂E₁₀. Se utilizarán fosfolípidos neutros con distintas características de la cadena carbonada.
- Estudiar la relación de la actividad Ca²⁺-ATPasa con el largo de cadena carbonada y la presencia de insaturaciones en los fosfolípidos en micelas mixtas.
- Determinar el radio hidrodinámico de las poblaciones de micelas mixtas compuestas por C₁₂E₁₀ y distintos fosfolípidos utilizados para reconstituir la PMCA. Para ello se utilizará la espectroscopia de correlación de fluorescencia.
- Determinar el nivel de intermediarios fosforilados de la PMCA cuando se la reconstituye en sistemas compuestos por diferentes relaciones C₁₂E₁₀/PC y ensayando fosfatidilcolinas de distintas cadenas hidrocarbonadas.
- Estudiar el sitio de unión de ácidos grasos insaturados. Para ello sintetizaremos y utilizaremos un análogo fotoactivable del ácido oleico (199).
- Localizar mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF) el/los sitio(s) de unión e interacción de los ácidos grasos insaturados con la PMCA.

PARTE II

METODOLOGÍAS

Capítulo 4

Metodologías

4.1 . Obtención de PMCA purificada

4.1.1. Aislamiento de membranas plasmáticas de eritrocitos humanos

El aislamiento de membranas de eritrocitos humanos se fundamenta en la hemólisis hipotónica de los glóbulos rojos mediante una solución, con el agregado de EGTA para quelar el Ca^{2+} presente y generar la disociación de la calmodulina unida a la PMCA (200).

Las membranas plasmáticas de eritrocitos humanos se obtuvieron a partir de 450 ml de sangre recientemente extraída de donantes voluntarios (provista por el Centro de hemoterapia FUNDOSOL, Buenos Aires). Los glóbulos rojos se separaron por centrifugación a 5000 *g* durante 10 min y se lavaron con una solución isotónica de NaCl (150 mM). Se procedió a la hemólisis mediante el agregado de 8 volúmenes de una solución hipotónica (15 mM de MOPS-KOH, pH 7.4 a 37 °C y 1 mM EGTA-K). Las membranas de los eritrocitos lisados se separaron por centrifugación a 20000 *g* durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento 5 veces (hasta obtener un sobrenadante libre de hemoglobina). Se realizó un último lavado con una solución hipotónica conteniendo CaCl_2 (15 mM MOPS-K, pH 7.4 a 10 °C; 5 μM CaCl_2). Todo el proceso se realizó a 4°C y finalmente se congelaron las membranas a -80 °C hasta el día siguiente.

El rendimiento usual de este proceso es de 2 a 3 mg de proteína total por ml de paquete de glóbulos rojos (se trata de glóbulos rojos desplasmatizados, aproximadamente 80-90% de hematocrito).

4.1.2. Purificación de la PMCA a partir de membranas aisladas de eritrocitos humanos

La purificación de la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática a partir de membranas aisladas de eritrocitos humanos se basa en la unión de alta afinidad entre la PMCA y el complejo Ca^{2+} -Calmodulina (CaM). Se realizó una cromatografía de

afinidad utilizando una columna de agarosa-calmodulina según el procedimiento descrito por Roufogalis y col. (201).

La suspensión de membranas fragmentadas de eritrocitos fue centrifugada a 20000 g durante 20 min. El *pellet* compuesto por membranas se resuspendió en 5 volúmenes de *buffer* de extracción (130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM MOPS-K, pH 7.2 a 25 °C, 100 μM CaCl₂, 2 mM DTT, 0.5 % p/v C₁₂E₁₀ y 20 % p/v glicerol), se incubó por 10 minutos a 4 °C, manteniendo la solución en agitación suave. Posteriormente, se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos. La utilización de un detergente no iónico en dichas condiciones solubiliza a las proteínas integrales de membrana en micelas del detergente, por encima de la concentración micelar crítica. El sobrenadante resultante de la centrifugación se sembró en una columna de agarosa-CaM (Sigma-Aldrich, St.Luis, MO, USA), previamente equilibrada con 5 volúmenes de *buffer* de extracción a un flujo constante de 0.0106 ml. cm⁻².s⁻¹. Para extraer la enzima remanente, se reiteró el proceso de extracción sobre las membranas aisladas. El sobrenadante de esta segunda extracción también se sembró en la columna de afinidad. Posteriormente, se realizó el lavado de la columna con 20 volúmenes de *buffer* de lavado (130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM MOPS-K, pH 7.20 a 25 °C, 100 μM CaCl₂, 2 mM DTT, 0.005 % p/v C₁₂E₁₀ y 20 % p/v glicerol) para remover otras proteínas que puedan unirse a la matriz de manera inespecífica. La PMCA permanece unida a la calmodulina debido a la elevada concentración de calcio libre. Luego, se procedió a la obtención de la PMCA purificada, haciendo pasar *buffer* de elución (130 mM KCl, 20 mM MOPS-K, pH 7.20 a 25 °C, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.005 % p/v C₁₂E₁₀ y 20 % p/v glicerol) a través de la columna de afinidad. La presencia de EGTA como quelante de Ca²⁺ disminuye la concentración del ion en la columna de manera que el complejo Ca²⁺-CaM-PMCA se disocia y la proteína se recupera en el *buffer* de elución. Este proceso de purificación asegura la deslipidización casi completa de la PMCA. Durante la elución, el contenido de proteína en las diferentes fracciones se siguió mediante la intensidad de fluorescencia a 333 nm –excitando a 280 nm– correspondiente a la emisión de los residuos de triptófano de la proteína. Se conservaron las fracciones de mayor intensidad de fluorescencia y se procedió a reunir las en un *pool* de enzima. En algunos casos, las fracciones no se mezclaron y se almacenaron por separado el pico de elución y algunas fracciones de mayor intensidad de fluorescencia. Posteriormente, el *pool* de

enzima se dividió en fracciones de 500 µl que se almacenaron a -180 °C hasta su utilización. Se separaron alícuotas para la cuantificación de proteínas. La isoforma predominante en los eritrocitos humanos es la PMCA4, representa el 80% y la PMCA1 el 20%. (202).

La integridad de la PMCA obtenida se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE) con posterior tinción de las proteínas presentes con *Coomassie Blue R*. La **Figura 4.1** muestra un SDS-PAGE, donde se puede observar una banda mayoritaria de M_r 134000 correspondiente a la PMCA (62). La cuantificación de la proteína purificada se realizó incluyendo en el gel una curva de calibración de seroalbúmina bovina (*Sigma-Aldrich*) y utilizando un software (*Gel-Pro Analyser, Media Cybernetics, Inc.*) para determinar la densidad óptica asociada a la masa de proteína. La concentración de proteína obtenida se encuentra en el rango de 300 a 700 nM. El rendimiento de la purificación es de aproximadamente 1 µg de PMCA por cada mg de proteína total obtenido en la primera fase del proceso (**Sección 4.1.1**).

4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó de acuerdo al método de Schägger y col. (203). Esta metodología, con ligeras variantes, se utilizó para cuantificar y confirmar la pureza de todas las preparaciones de PMCA.

Los geles de poliacrilamida se polimerizaron sobre placas de vidrio de 7,3 x 10,1 cm y 8,3 x 10,1 cm con separadores de 0,75 mm. Se utilizó un gel concentrador al 4 % de poliacrilamida (29,2 % (p/v) y bis-acrilamida 0,8 % (p/v), y un gel separador de 7,5 % de poliacrilamida. El gel separador consistió en Tris 0,375 M, pH 8,8; Acrilamida/Bisacrilamida 7,5 % (p/v); SDS al 0,1 % (p/v); Persulfato de amonio (PSA) al 0,1 % (p/v) y TEMED al 0,07 % (v/v). El gel concentrador consistió en Tris 0,125 M, pH 6,8; Acrilamida/Bisacrilamida 4 % (p/v); SDS al 0,1 % (p/v); PSA al 0,05 % (p/v) y TEMED al 0,05 % (v/v). Las muestras fueron precipitadas con 10% ácido tricloroacético (TCA) durante 1 h a 4°C y posteriormente centrifugadas a 10000 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 10 µl de *buffer* muestra (50 mM Tris-HCl, pH 7,00 a 10°C, 20 % glicerol, 4% SDS, 200 mM DTT, 0,01% azul de bromofenol).

Cuando el objetivo de la electroforesis fue la cuantificación proteica, se sembró en el gel una curva de SAB en el rango de 0.1 a 1.0 μg ; cuando correspondió también se agregaron marcadores de peso molecular. Para la corrida electroforética, se utilizó un equipo de electroforesis vertical (*BioRad*, CA, USA) con un *buffer* de Tris 0,1 mM, tricina 0,1 M y SDS 0,2 % (pH 8,25 a 25 °C) en el compartimiento catódico y un buffer compuesto por Tris-HCl 0,1 mM (pH 8,9 a 25 °C) en el anódico. La corrida electroforética se desarrolló durante 10 min a 90 V y entre 40 a 60 min a 110 V, a temperatura ambiente.

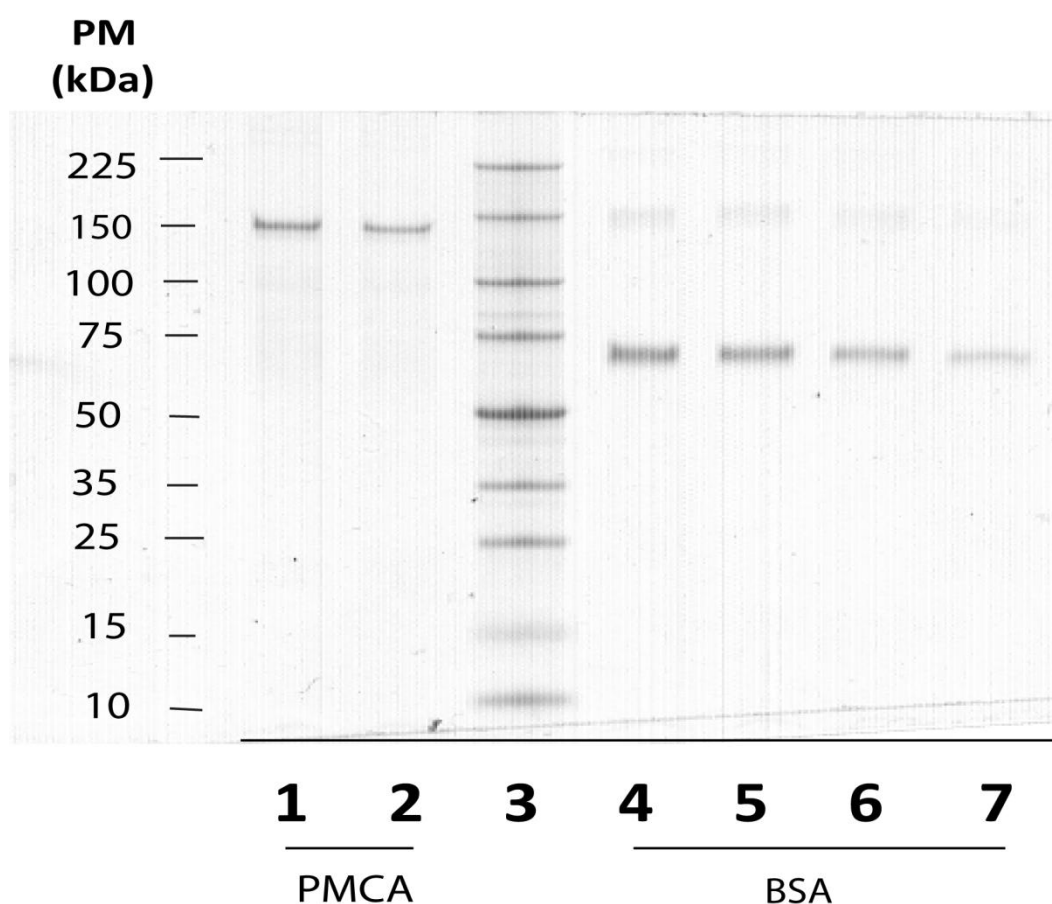


Figura 4.1. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). SDS-PAGE de una muestra de PMCA purificada desde eritrocitos humanos. En las calles 1 y 2 se puede observar la bandas correspondiente a la PMCA, 20 y 15 μl (134 KDa aprox.). En la calle 3, marcadores de peso molecular – cuyos pesos moleculares son indicados en la ordenada. Las calles 4 a 7 corresponden a una curva de calibración con SAB (8 a 2 μl de una solución de SAB 0.1 mg/ml).

4.3. Formación de micelas mixtas detergente-fosfolípidos

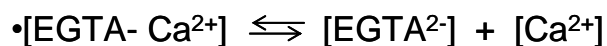
Cada fosfolípido puro (Avanti Polar Lipids) se pesó y se disolvió en cloroformo. El solvente fue evaporado a presión reducida mediante un rotavapor y la película lipídica en el balón fue resuspendida e hidratada con una solución acuosa de C₁₂E₁₀ hasta alcanzar una fracción molar fosfolipídica de 0.8 (1 mg/ml fosfolípido y 0.3 mg/ml de C₁₂E₁₀). Se sonicaron las preparaciones a temperaturas mayores a las de transición para cada fosfolípido ensayado hasta desaparición de turbidez. Estas soluciones *stock* fueron almacenadas, en viales de vidrio con cierre de *teflón*, a -20 °C por un período máximo de 7 días. Previo al cierre de cada vial se aplicó una corriente de nitrógeno el oxígeno del mismo con el fin de evitar la oxidación de los lípidos.

4.3.1. Cuantificación de fosfolípidos

Se determinó la concentración de fosfolípidos en las distintas preparaciones de acuerdo al procedimiento descrito por Chen y col. (204) con algunas modificaciones. Se expusieron las muestras y los patrones de distinta concentración de fosfato a 100 °C, con el fin de evaporar el agua. Se adicionó a cada muestra 0.1 ml de HNO₃, 0.9 ml de HClO₄ y se mantuvieron a 190 °C durante 30 min. Con este procedimiento se mineralizan los componentes orgánicos de las preparaciones y se libera el fosfato de los fosfolípidos. La masa de este compuesto en las muestras y en los patrones se determinó según el método descrito en Fiske & Subbarow (205).

4.4. Determinación de la concentración de Ca²⁺

La concentración de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_{libre}) fue determinada con el programa computacional *Max Chelator* (206) y controlada con un electrodo sensible a Ca²⁺ (Orion 920, Beverly, MA). En todos los casos se utilizaron *buffers* EGTA-Ca²⁺. La concentración de EGTA fue 2mM y la concentración de CaCl₂ se varió para obtener la [Ca²⁺]_{libre} necesaria. El uso de un *buffer* EGTA- Ca²⁺, y no simplemente CaCl₂, permite controlar la [Ca²⁺]_{libre}. La siguiente ecuación describe como a partir de una concentración de Ca²⁺ y EGTA dada se obtiene una concentración de Ca²⁺ libre acotada por el equilibrio entre las formas quelada y libre de este catión:



4.5. Determinación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA purificada

La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, expresada como la velocidad de hidrólisis de ATP por masa de proteína, se determinó a 37 o 25 °C mediante un método colorimétrico o bien por un método radiactivo según la concentración de ATP empleada en cada experimento. El medio de reacción para la medida de actividad enzimática consistió en: 130 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7.4 a 37 °C), 3.75 mM MgCl_2 , 120 μM $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (excepto donde se indica lo contrario), 2 mM EGTA y suficiente CaCl_2 para permitir la concentración de calcio libre deseada en cada caso particular. La concentración de ATP fue de 2 mM o 30 μM según se explicita en cada experimento. En todos los casos las condiciones de medida se establecieron para que la hidrólisis de ATP no supere el 10 %, asegurándonos condiciones de velocidad inicial. Se calculó la actividad Ca^{2+} -ATPasa como la diferencia entre los valores obtenidos en presencia y ausencia de Ca^{2+} .

4.5.1 Medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de fosfatidilcolina

Se utilizó un medio de reacción similar al descrito previamente. La concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ fue de 70 μM . La concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ fue constante y se agregó una concentración adecuada de los distintos fosfolípidos ensayados, para alcanzar la fracción molar de fosfatidilcolina deseada. La concentración de PMCA utilizada fue de 8 nM.

4.5.2 Medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de concentraciones crecientes de AS86 y ácido oleico

Se utilizó un medio de reacción similar al previamente descrito pero en presencia de una concentración fija de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ 120 μM y DMPC 35 μM ($X_{\text{DMPC}} = 0.25$). La concentración final de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ fue de 5 μM . El AS86 se disolvió en DMSO y se incorporó a las micelas mixtas aumentando la X_{AS86} . Por otro lado, el ácido oleico (Sigma) se disolvió en etanol y se incorporó a las micelas mixtas. La concentración de PMCA en estos experimentos fue de 7 nM.

4.5.3 Método colorimétrico por punto final

Se determinó actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA mediante la cuantificación del fosfato (Pi) liberado, como producto de la hidrólisis de ATP, mediante el procedimiento descrito por González Flecha y col. (200) con ligeras modificaciones. Este procedimiento se basa en la transformación cuantitativa del fosfato en fosfomolibdato de amonio y de este en óxidos de molibdeno los cuales se cuantifican midiendo su absorbancia a 690 nm (205).

La reacción enzimática se inició mediante el agregado de ATP (2 mM de concentración final) al medio de reacción que contenía todos los componentes necesarios incubados a 37 °C en un baño termostatzado. La reacción transcurrió durante 35-40 min (excepto que se indique una condición diferente). Se detuvo el proceso mediante el agregado de una solución compuesta por NaHSO_3 0.277 g/l; Na_2SO_3 0.277 g/l, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico 46 mg/ml, H_2SO_4 3.75 g/l y SDS 0.9 %. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y luego se procedió a la medida espectrofotométrica a 690 nm. Concomitantemente, se realizó una curva de calibración, con concentraciones de Pi conocidas, que permitió transformar los valores de absorbancia en moles de Pi.

4.5.4. Método radiactivo

Este procedimiento se basa en la determinación del $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ hidrolizado a partir de $[\gamma\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y de su transformación en $[\text{}^{32}\text{P}]\text{fosfomolibdato de amonio}$. Este complejo puede ser separado de la mezcla de reacción mediante su extracción con isobutanol y medición de la radiactividad asociada mediante un contador de centelleo líquido (113).

La reacción se inició por el agregado de una solución de $\gamma[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Perkin-Elmer Life Sciences) al resto de los componentes del medio. La concentración final de ATP en el medio de reacción fue de 30 μM y la temperatura fue de 25 °C. La reacción se dejó transcurrir durante el tiempo necesario para cada experimento y se detuvo mediante la incorporación, con agitación continua, de una solución de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 % (p/v) en ácido perclórico al 5% (v/v), e inmediata incorporación de isobutanol. Se prolongó la agitación 25 s más con el fin de favorecer el proceso de extracción. Luego los tubos se centrifugaron durante 5 min a 3.000 rpm. Se tomó 1 ml de la fase orgánica

y se mezcló con 2,5 ml de 0,5 N NaOH en viales de vidrio para determinar la radiactividad asociada. El NaOH modifica el complejo fosfomolibdico amarillo que produce *quenching* (apagamiento) de la señal. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Rackbeta Pharmacia Wallac, Suecia, Oy-1214). De igual forma, se midieron alícuotas de la solución $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ usado en el ensayo, con el objetivo de obtener la actividad específica utilizada.

Los valores de blancos de reactivos se obtuvieron agregando la solución de molibdato y ácido perclórico a los tubos conteniendo la PMCA antes de la incorporación de la solución con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

4.6. Determinación de los niveles de intermediarios fosforilados (EP) de la PMCA

Con el objetivo de determinar la concentración de intermediarios fosforilados (EP) se utilizó el método descrito en (207).

La fosforilación de la PMCA se determinó a 25 °C en un medio de reacción compuesto por MOPS-K 30 mM (pH 7.40 a 25 °C), KCl 120 mM, $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{libre}}$ 1.85 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 30 μM , EGTA 2 mM, suficiente CaCl_2 para alcanzar una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = 100 \mu\text{M}$ y LaCl_3 75 μM (la presencia de Lantano será necesaria sólo en determinados experimentos, donde será indicado). La concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ fue constante y se agregó una concentración adecuada de los distintos fosfolípidos ensayados, hasta alcanzar la fracción molar deseada de los mismos. La reacción se inició por el agregado de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bajo agitación vigorosa, se dejó reaccionar por 30 s y se detuvo mediante el agregado de una solución fría de TCA (10% p/v concentración final).

Los tubos de reacción se dejaron durante 1 h en un baño de hielo-agua. Posteriormente, se procedió a aislar a la PMCA del resto de los componentes de la mezcla de reacción con el fin de determinar la concentración de intermediarios fosforilados. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 4 min a 10.000 *g*, se descartaron los sobrenadantes y se lavaron los *pellets* conteniendo la proteína fosforilada con una solución de TCA 10% - H_3PO_4 50 mM y luego con agua bidestilada. Los *pellets* lavados se resuspendieron en *buffer* muestra (composición previamente descrita, Sección 4.3) y los componentes de la mezcla se separaron mediante SDS-PAGE. Dado que las condiciones de acidez y baja temperatura aumentan

la estabilidad del intermediario fosforilado, la electroforesis fue llevada a cabo a pH 6,3 y 14 °C, en un gel 7,5% T y 1% C; se utilizó un *buffer* de corrida, el mismo estaba compuesto por: MOPS-Tris 175 mM pH 6,5 y SDS 0,1%. La corrida se desarrolló a 14 °C a 80 V durante 10 min y luego a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzara 10 cm desde el punto de siembra. El gel fue teñido y decolorado como se indica en la Sección 4.2. Luego el gel se deshidrató mediante un dispositivo que provee calor (*Dry-Gel*) conectado a una bomba de vacío y se expuso a una placa "*Storage Phospho Screen*" (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) para obtener la autorradiografía del mismo. Se realizó una curva de calibración con diferentes diluciones del [γ -³²P] ATP y se expuso junto al gel. A partir de las imágenes digitales de la autorradiografía y de la tinción del gel, se determinó la intensidad de las bandas correspondientes utilizando un *software* (*Gel-Pro Analyser, Media Cybernetics, Inc.*). A partir de la curva de calibración de SAB y [γ -³²P]ATP se calcularon la masa de PMCA y los moles de EP formados. De esta manera se pudo calcular la relación EP/PMCA (nmoles/mg).

4.7. Caracterización de la transición micela-vesícula

4.7.1. Dispersión de luz (SLS)

Las medidas de dispersión de luz se realizaron a 37 °C, en una cubeta de cuarzo de 3 x 3 mm y las determinaciones se obtuvieron en un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 equipado con un control de temperatura *peltier* Jasco ETC-237T. Se registraron medidas durante un rango de 2 min (cada 1 s) a 470 nm. Cada muestra analizada tiene una composición idéntica a la utilizada en la medida de actividad enzimática (Sección 4.5) sin el agregado de PMCA.

4.7.2. Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS)

Previo al análisis mediante FCS, las muestras se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con una concentración de 10 nM de Rhodamina-DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- (lissamina rhodamina B sulfonil)) (Avanti Polar Lipids). Esta concentración de sonda fluorescente permitió obtener un promedio de 0.1 moléculas fluorescentes por micela, que permite una adecuada relación señal-ruido. Las determinaciones fueron realizadas a 25 °C con un microscopio confocal

Olympus FV-1000 (Olympus, Japón) utilizando un objetivo Olympus UPLSAPO 60X de inmersión en aceite de 1.35 de apertura numérica y 0.15 mm de distancia de trabajo. Para realizar la calibración se utilizó una solución de SAB 50 nM ($D = 63 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) marcada con isotiocianato de fluoresceína (SAB-FITC) en GndHCl 0.1 M (para prevenir su dimerización) (208). Se colocaron sobre un cubreobjetos limpio en una platina adecuada 60 μl de cada muestra para su observación. La excitación se realizó a 473 nm (FITC) y a 559 nm (Rhodamina) mediante el láser de estado sólido del equipo. Se enfocó el láser sobre un punto de la muestra y se registró la intensidad de fluorescencia durante 3 minutos en el modo de conteo híbrido (o pseudo-conteo) de fotones del equipo. La frecuencia de muestreo fue de 10 a 50 kHz para asegurar la mejor definición de las curvas de autocorrelación. Cada muestra fue medida a 25 °C unas 5 veces. Las curvas experimentales de autocorrelación y el ajuste del modelo de difusión fueron realizados con el programa SimFCS (LFD, UCI, Irvine, EEUU). Las curvas de autocorrelación (209) se generaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

donde $\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle$ representa la fluctuación a tiempo t y τ representaría un intervalo de tiempo. La curva de autocorrelación obtenida experimentalmente pudo ser descripta por un modelo de difusión 3D pasivo:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{w_0}{z_0} \right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2)$$

donde N representa el promedio del número de moléculas en el volumen de observación, w_0 y z_0 representan la cintura radial y axial del volumen de observación y γ es un factor de corrección geométrico para el volumen efectivo con un valor de $1/\sqrt{8}$ para un perfil de detección Gaussiano. Donde τ_D es el tiempo de residencia promedio

de una partícula en el volumen de observación. El coeficiente de difusión D de una molécula puede ser calculado a partir de τ_D :

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \quad (3)$$

Considerando una partícula esférica el radio hidrodinámico puede ser calculado mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi D \eta} \quad (4)$$

4.8. Simulaciones computacionales de dinámica molecular

La estructura de la PMCA, que comprende los aminoácidos 1-1056, se obtuvo por un modelo de homología tomando la estructura de la SERCA como modelo (Protein Data Bank code 1T5S) mediante la utilización de la versión 9.14 del programa MODELLER y el alineamiento publicado previamente por Penniston y col. (150). Los residuos del C-terminal (posiciones 1057-1205) no fueron incluidos en el modelo. La proteína se incluyó en una caja triclinica y se embebió en membranas compuestas por moléculas de DMPC (1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfolina) o DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glicerol-3-fosfolina). Ambas membranas fueron previamente equilibradas y contenían inicialmente 512 moléculas de lípidos. Las simulaciones se realizaron en GROMACS versión 4.5.4 (210) usando el campo de fuerza G53a6. Con el fin de incluir a la PMCA en dichas membranas, se utilizó el complemento InflateGRO2 (211), y las membranas finalmente quedaron compuestas por 454 moléculas de DMPC y 467 de DOPC. Los sistemas fueron hidratados con moléculas de agua tipo “*simple point*”, además se agregaron moléculas de sodio y de cloruro hasta una concentración final de 0.15 M. Luego de la minimización mediante el algoritmo de máxima pendiente, se sometieron los sistemas a simulaciones donde se restringen las posiciones de los carbonos alfa (CA) a 313 K y con saltos de tiempo de 2-fs. Los primeros 2 ns se realizaron bajo condiciones NVT (“N” es un número constante de partículas, “V” es el volumen, y “T” es la temperatura) y luego se realizaron 2 ns adicionales bajo condiciones NPT (donde “P” es presión). Posteriormente, los sistemas se sometieron a

5 ns de simulaciones de dinámica molecular sin restricciones a 1 Bar con acoplamiento débil de temperatura. Se consideraron explícitamente todos los átomos de hidrógeno y las uniones covalentes de la proteína se restringieron mediante LINCS (212). Los experimentos de dinámica molecular aquí descriptos fueron realizados por el Dr. Mauricio Sica (*Laboratorio de Bioenergías, IEDS, CONICET, Centro Atómico Bariloche, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina*) en el marco de una colaboración.

4.9. Síntesis de un análogo fotoactivable del ácido oleico: ácido 8-(*o*-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico (AS86)

La estrategia de síntesis que aquí se presenta está basada en los trabajos de Atlasovich y col. (213) y Rossi y col. (199). Dada la longitud y complejidad de cada proceso, la síntesis del AS86 se realizó en tres pasos que detallamos a continuación.

4.9.1. Síntesis del ácido 5-azido salicílico

En un balón de 1L de capacidad se agregaron 2.0 gramos de ácido 5-amino salicílico (Sigma-Aldrich) se disolvieron en una solución acuosa de H₂SO₄ (Carlo Erba) 2.5M en agitación. En un baño de hielo (4 °C) y se agregó lentamente agua destilada fría hasta una concentración final de H₂SO₄ 0.94 M. El proceso se realizó bajo luz roja. Desde una bureta se agregaron gota a gota, a temperatura controlada, 1.12 gramos de NaNO₂ (Merck) disueltos en 10 ml de agua destilada, durante 15 min. Se agitó durante 1 h hasta ver el precipitado de sal de diazonio. Posteriormente, se agregaron a la solución 1.40 gramos de NaN₃ (Sigma) disueltos en 40 ml de agua. El agregado debe ser lento para evitar proyecciones. La solución se tornó marrón claro y se mantuvo en agitación por 24 hs. Se filtró al vacío con usando un kitasato. El compuesto obtenido, insoluble, que quedó en el papel de filtro sobre el embudo tipo *Büchner* se lavó con abundante agua acidulada fría. Se procedió al secado del compuesto sobre un papel de filtro nuevo en un desecador al vacío.

Se realizó el control del producto mediante TLC (**Fase móvil:** Acetato de etilo: Metanol, 3:1; **Fase estacionaria:** Sílica-Gel modificada F254, *Merck*), encontrando una única mancha fotoactivable a la luz UV que se diferenció de la mancha del precursor ácido 5-amino salicílico. Se disolvió una fracción del compuesto obtenido en CDCl₃ y se realizó un control de la identidad del compuesto por ¹H-RMN de 300 MHz (*Realizado*

por el servicio de RMN de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) encontrando los siguientes δ (ppm) característicos: δ 1.53 (m, 12 H), 1.80 (mancho, 4 H), 2.46 (t, 2H), 7.14 (s, 1H aromático), 7.22, 7.69 (dd, 2H aromático). El compuesto se almacenó al abrigo de la luz y la humedad a 4 °C.

4.9.2. Síntesis del precursor ácido 8-(5'-Azidosalicilamido) octanoico (AS8) a partir del ácido 5-azido salicílico

La segunda etapa de la síntesis se realizó bajo luz roja. En las siguientes etapas se extremaron los cuidados para evitar la humedad. En un balón de 250 ml de capacidad se agregaron 0.825 g de N-hydroxisuccinimida (Sigma) y 1.081 g de ácido 5-azido salicílico proveniente de la síntesis descrita en 4.9.1. Se disolvieron ambos compuestos en aproximadamente 12 ml tetrahidrofurano (THF, Carlo Erba) previamente destilado y seco. Se azeotropó el agua restante mediante dos evaporaciones sucesivas de THF con corriente de N₂. Las trazas de solvente se eliminaron mediante secado al vacío. Luego se agregaron 7 ml de THF seco y se disolvieron los compuestos en agitación. Se enfrió el sistema a 4°C. Posteriormente, se agregaron 1.479 g de Diciclohexilcarbodiimida (DCC, Sigma) disueltos en 7 ml de THF. El agregado se realizó gota a gota y se dejó con agitación durante toda la noche.

Al día siguiente se procedió al filtrado del producto de la reacción, mediante lana de vidrio, sobre una solución de 1.14 g de ácido-8- aminooctanoico (Sigma) en 2 ml de piridina (Carlo Erba) previamente destilada y seca. Se dejó transcurrir la reacción con agitación constante por 72 hs.

Para recuperar el AS8, se acidificó el crudo de reacción con HCl 12M que mantiene neutro el AS8, se filtró y se secó al vacío para eliminar los restos de piridina y THF. El residuo sólido se disolvió en acetato de etilo (Carlo Erba) y se realizó una extracción con una solución acuosa de HCl 0.01M. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro (Merck). Se filtró para eliminar la sal y posteriormente se evaporó el solvente mediante destilación a presión reducida.

Se realizó el control del producto obtenido mediante TLC (**Fase móvil:** Cloroformo: Metanol, 10:1; **Fase estacionaria:** Sílica-Gel modificada F254, Merck), encontrando una única mancha fotoactivable ($R_f = 0.40$) que se diferenció de la

mancha del precursor ácido 5-azido salicílico. En la **Figura 4.2** podemos observar un espectro característico del AS8, con un máximo en 258 nm y un pico ancho, característico en la zona de 320-330 nm. Se disolvió una porción del compuesto obtenido en CDCl_3 y se realizó un control de la identidad del compuesto por ^1H -RMN de 300 MHz (*Servicio de RMN de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*) encontrando los siguientes δ (ppm) característicos δ 1.22 (m, 10 H), 2.18 (m, 2 H), 3.27 (m, 2H), 6.28 (s ancho, 1 H), 6.94 (m, 3H aromático). El compuesto se almacena al abrigo de la luz y la humedad a 4 °C.

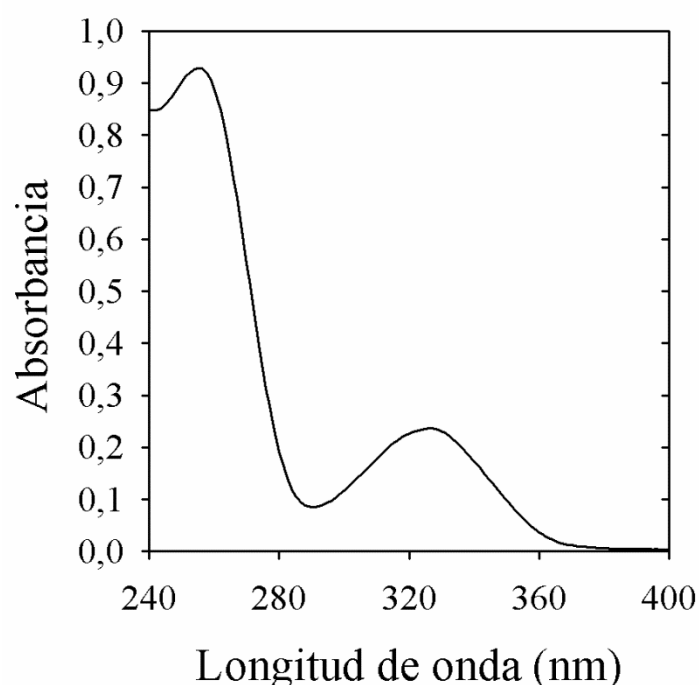


Figura 4.2. Espectro de absorción UV del AS8 en etanol

4.9.3. Síntesis del ácido 8-(*o*-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico (AS86) a partir del AS8

La tercera y última etapa del proceso de síntesis también se efectuó bajo luz roja. En un Reacti-Vial (Thermo-Scientific) de 1 ml se agregaron 25 mg de AS8, 12 mg de ácido hexanoico (Sigma), 46 μl de anhídrido hexanoico (*Sigma*) y 8 μl de piridina destilada y seca (Merck). La reacción de acilación se realizó con agitación constante a

temperatura ambiente (25 °C), durante 48 hs. La acilación del AS8 fue completa en las condiciones descriptas, para lo cual fue fundamental la pureza del anhídrido hexanoico como se comprobó por ^1H -RMN (199). Una vez finalizada la reacción de acilación se agregaron pequeñas porciones de CH_2Cl_2 (Carlo Erba) previamente destilado y se evaporó bajo corriente de N_2 , para eliminar la piridina por azeotropado. Las trazas se eliminaron mediante secado al vacío. Este procedimiento se realizó al menos tres veces. De esta manera también se eliminó el ácido hexanoico remanente. El reactivo se guardó en el desecador bajo vacío durante 24 hs. En la **Figura 4.3** podemos observar un barrido espectral característico del AS86 en etanol, con un máximo en 251 nm, zonas características de absorción entre de 280-290 nm y ausencia del pico amplio a 320-30 nm presente en el precursor AS8 (**Figura 4.2**).

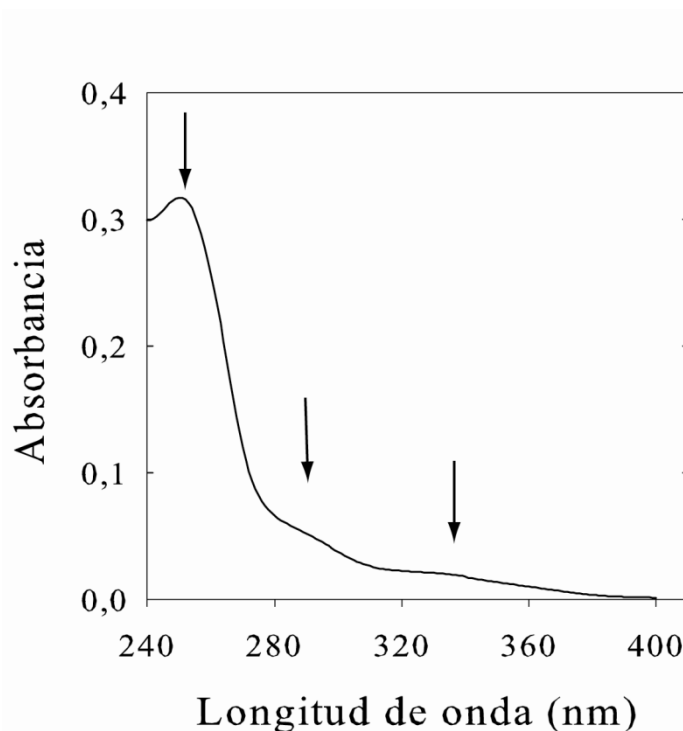


Figura 4.3. Espectro de absorción UV del AS86 en etanol. Las flechas presentes en la figura indican las zonas características del espectro (ver texto, Sección 4.9.3)

Se realizó el control del producto obtenido mediante TLC (**Fase móvil:** Cloroformo: Metanol, 5:1; **Fase estacionaria:** Sílica-Gel modificada F254, Merck), hallando una mancha única fotoactivable ($R_f = 0.52$) tras irradiar la placa con luz UV, que se diferenció de la mancha correspondiente al precursor AS8. Se disolvió una fracción del compuesto obtenido en CDCl_3 y se realizó un control de la identidad del

compuesto por ^1H -RMN de 300 MHz (*Servicio de RMN de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*) encontrando los siguientes δ (ppm) característicos: δ 0.75 (t, 3 H), 1.27-1.47 (m, 16 H), 2.17 (m, 2H), 2.40 (m, 2 H), 3.18-3.27 (m, 2H), 6.24 (s ancho, 1H), 7.02-7.35 (mu, 3H aromáticos). El compuesto se almacena al abrigo de la luz y la humedad a 4 °C. Se realizaron alícuotas de la totalidad del AS86 sintetizado en cada ocasión y se almacenaron por separado, para minimizar el contacto del reactivo con la humedad ambiente.

En la **Figura 4.4** podemos ver un esquema del proceso de síntesis:

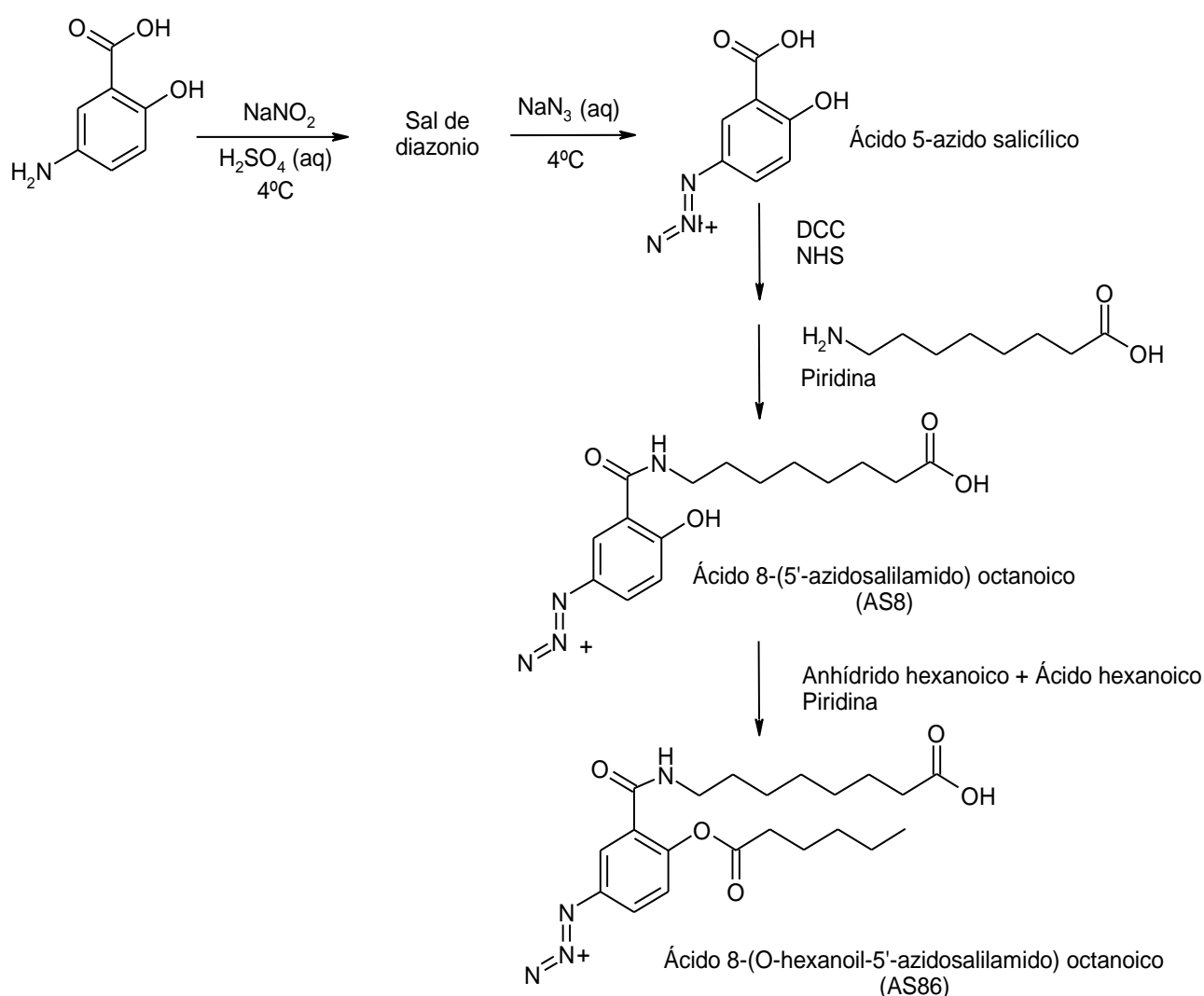


Figura 4.4. Esquema de síntesis del ácido 8-(o-hexanoil-5'-azidosalicilamido) octanoico (AS86)

Referencias: DCC, diciclohexilcarbodiimida. NHS, N-hidroxisuccinimida.

4.10. Condiciones de fotólisis del AS86

4.10.1. Fotomarcación de la PMCA con AS86: Condiciones de fotólisis

Se tomó un vial conteniendo una determinada alícuota de reactivo, se agregó dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) para obtener la concentración deseada y se agitó hasta disolución total y homogénea del AS86. Posteriormente, en una *placa de toque* se colocaron los reactivos para la incorporación del AS86 a las micelas de $C_{12}E_{10}$ conteniendo PMCA. Se agregó $C_{12}E_{10}$ en distintas concentraciones, *buffer* utilizado para la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa (Sección 4.5), $CaCl_2$ para obtener una $[Ca^{2+}]_{libre} = 5 \mu M$ y la enzima disuelta en *buffer* de elución. Luego se agregó en cada condición la cantidad de AS86, disuelta en DMSO y se homogeneizó. Se incubaron todas las condiciones por agitación durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se fotolisaron las muestras mediante una lámpara UV (C. DESAGA, HEIDELBERG, 60 W) a una distancia de 1 cm durante 2 min.

4.10.2. Fotomarcación del péptido C28W con AS86

Una alícuota del péptido C28W (/LRRGQILWFRGLNRIQTQIKAFSSS/, cedido por el Dr. Ariel Caride, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota) se disolvió en un *buffer* de composición similar al utilizado para la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa (130 mM KCl, 30 mM MOPS-K (pH 7.4 a 37 °C), 3.75 mM $MgCl_2$) y se agregó $CaCl_2$ para alcanzar una concentración de $[Ca^{2+}]_{libre}$ de 5 μM . Dadas las características hidrofóbicas del péptido se ha descrito que puede ser susceptible a agregación en solución acuosa (214). Por esta razón, la solución del C28W en *buffer* se preparó en el día de su utilización y previo a la realización del experimento de fotomarcación se comprobó la integridad del péptido mediante la realización de un barrido espectral de 200 a 400 nm. En la **Figura 4.5** se observa el espectro de absorción del péptido en el *buffer* utilizado. Como vemos, existe un máximo en la zona de 280-300 nm correspondiente a la absorción del triptofano presente en el péptido. Por otro lado, no se observó un aumento de la absorbancia a longitudes de onda mayores (400-500 nm) lo que descartó la posibilidad de agregación.

Se procedió a realizar la fotomarcación con AS86. De manera análoga a lo descrito en la *Sección 4.10.1*, se tomó un vial conteniendo una alícuota de AS86, se agregó DMSO para obtener la concentración deseada y se agitó hasta disolución total y homogénea. Posteriormente, en una *placa de toque* se incorporó la solución del C28W, el *buffer* utilizado para la medida de actividad Ca^{2+} -ATPasa (*Sección 4.5*) y CaCl_2 para obtener una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = 5 \mu\text{M}$. Luego en cada condición se agregó AS86 disuelto en DMSO y se homogeneizó. Se procesó una condición en ausencia de AS86 como control. Las muestras se incubaron con agitación durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la fotólisis de las muestras mediante una lámpara UV a una distancia de 1 cm durante 2 min. Luego de la fotólisis, se trasladó el contenido de la placa de toque a los tubos adecuados para medir la actividad Ca^{2+} -ATPasa y se procedió de acuerdo a lo descrito en la *Sección 4.5*. Se utilizó un medio de reacción similar con el agregado de una concentración fija de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ 120 μM y DMPC 35 μM ($X_{\text{DMPC}} = 0.20$). La concentración final de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ fue de 5 μM . Se incluyó CaM (120 nM final) en las condiciones donde se indica.

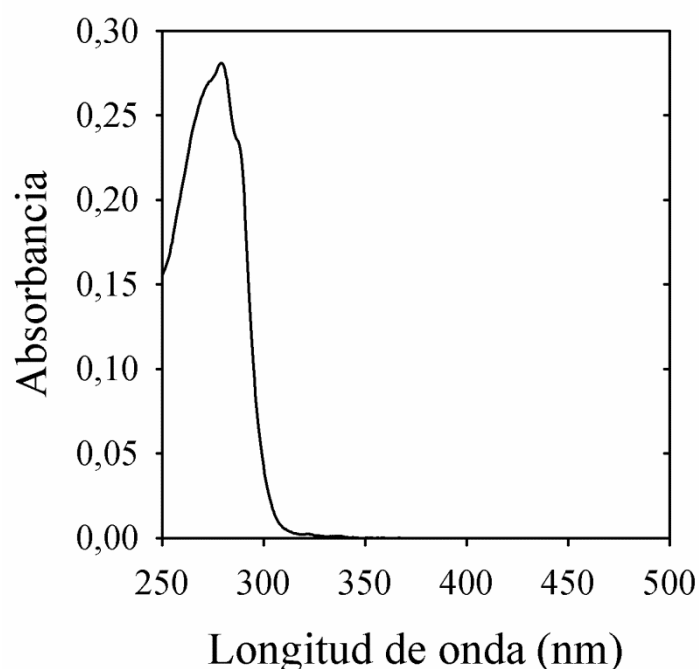


Figura 4.5. Espectro de absorción del péptido C28W en *buffer*.

4.11. Fotomarcación hidrofóbica de proteínas con [^{125}I] TID-PC/16

4.11.1. Incorporación de ^{125}I al precursor TID-PC/16

Se marcó el precursor TID-PC/16 (gentilmente cedido por el Dr. Brunner) por iodinación con ^{125}I siguiendo la técnica descrita por Weber & Brunner (71) con algunas modificaciones. Se disolvieron aproximadamente 100 nmoles del precursor en 50 μl de ácido acético y se adicionó 5 mCi de una solución Na^{125}I . La reacción se inició con el agregado de 5 μl de ácido peracético. En este medio, el I^- se oxida a I^+ y se incorpora al anillo aromático del reactivo fotoactivable por sustitución electrofílica. La reacción tuvo lugar durante 2 min agitando ocasionalmente y se detuvo con el agregado de 200 μl de 10% NaHSO_3 . Se agregaron 200 μl de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) y se agitó para extraer los lípidos en la fase orgánica. Se centrifugó a 2.000 g durante 2 min para completar la separación entre las fases y se removió la fase orgánica (inferior) con una jeringa de vidrio para transferirla a un *reactival* de 3 ml en donde se evaporó el solvente. Se preparó una columna de Silicagel 60 resuspendida en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) de 0,5 cm de diámetro y 5 cm de altura en la que se sembró el reactivo resuspendido en 200 μl de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). Se eluyó con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:1:4). La placa fue expuesta a una película sensible durante 18 h. Las fracciones en las que se reveló un compuesto marcado con idéntica movilidad a la del patrón de fosfatidilcolina (revelado con I_2 sobre la placa) fueron reunidas y homogeneizadas. El solvente se evaporó y la sonda se almacenó a -20°C en ambiente seco y al abrigo de la luz hasta el momento de uso.

4.11.2. Fotomarcación de la PMCA

El film de [^{125}I]TID-PC/16 se solubilizó con *buffer* de elución y una concentración final de DMPC 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se agitó enérgicamente y se incubó la preparación 15 min a temperatura ambiente. Este paso permite que la sonda se incorpore a las micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y dimiristoilfosfatidilcolina. Al mismo tiempo, se incubó la PMCA con AS86 en las concentraciones: (i) 5 μM donde se observó activación de la Ca^{2+} -ATPasa en ausencia de fotólisis a 254 nm y (ii) 10 μM donde se observó inhibición de la activación por CaM, tras fotolisar a 254 nm. Luego de esta incubación, se agregó CaCl_2 suficiente para obtener una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = 70 \text{ uM}$ y CaM 120 nM. Posteriormente, se

incluyó la mezcla de [125 I]TID-PC/16 en buffer de elución y DMPC. Luego de 5 min, se irradió la placa a 366 nm durante 10 min a temperatura ambiente utilizando un equipo Desaga UV-Vis (C. Desaga, Alemania). En todos los experimentos se incluyó una condición control - 1 mM EGTA, es decir, ausencia de $[Ca^{2+}]_{libre}$ - la que fue tomada como 100% de incorporación específica de la sonda.

Finalizada la fotólisis, se tomó el contenido de cada pocillo en un tubo diferente y se le agregó 10% TCA para precipitar las muestras (1 h a 4 °C) luego de lo cual se procedió a separar los componentes de la muestra por SDS-PAGE como se describió en la *Sección 4.3*. La radiactividad asociada a la PMCA marcada se midió por centelleo sólido con un contador gamma (1272 CliniGamma, Pharmacia) sobre las bandas cortadas del gel de poliacrilamida. Se determinó que la radiactividad promedio de regiones del gel en las que no se detectaron proteínas fue despreciable. Por otro lado, se incorporó en el gel una curva de calibración de SAB para cuantificar la masa de enzima. La cuantificación se llevó a cabo midiendo a 595 nm el colorante eluido cada banda con 1 ml de una solución compuesta por 50% de isopropanol y 3% SDS (215).

Se calculó la incorporación específica de la sonda como la relación entre la radiactividad y la cantidad de proteína medidas en cada banda (cpm/mol de proteína). Para poder comparar experimentos independientes cada medida se relacionó con la condición control antes mencionada (EGTA, 100%). Para el análisis de los resultados se considera a la determinación de la incorporación específica de [125 I]TID-PC/16 proporcional a la exposición del dominio transmembrana a los fosfolípidos (66).

4.12. Detección de fragmentos fotomarcados de la PMCA mediante espectrometría de masa

4.12.1. Fotomarcación de la PMCA

Se incorporó el AS86 en las micelas mixtas que contienen a la PMCA, de manera análoga a la explicitada en la *Sección 4.10*. Se utilizó agua *MilliQ* para todos los *buffers* y soluciones. Las concentraciones de reactivo utilizadas en la serie de experimentos de espectrometría de masa se especifican en cada condición en la sección "*Resultados y Discusión*".

4.12.2. *Proteólisis con V8 proteasa y electroforesis en geles de poliacrilamida*

La PMCA marcada con AS86, proveniente del proceso descrito en el ítem anterior, se dializó durante 3 hs a 10 °C frente a un *buffer* Tris-H₃PO₄ (pH 7.40 a 10°C). La diálisis se realizó con el objetivo de eliminar los iones Cl⁻ ya que inhiben la actividad de la proteasa V8 (216) y los iones K⁺ ya que forman un complejo insoluble con el SDS.

La digestión se realizó en presencia de 0.8% de SDS y 200 ng/μl (relación 1:500 V8: PMCA) en agitación constante, a temperatura ambiente, durante 3 hs. En estas condiciones la proteasa V8 digiere a la PMCA únicamente en los residuos de ácido glutámico 322 y 661, generando tres fragmentos (62,68). La reacción de digestión se detuvo agregando TCA a una concentración final del 10%. La precipitación se realizó durante 1 h, a 4 °C. Luego, se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 10 μl de *buffer* muestra (50 mM Tris-HCl, pH 7,00 a 10 °C, 20 % glicerol, 4% SDS, 200 mM DTT, 0,01% azul de bromofenol). Se procesó conjuntamente una muestra de SAB de 1 μg para incluir en el gel para ser utilizada como control en la detección por espectrometría de masa.

Los fragmentos proteicos producto de la digestión se resolvieron mediante SDS-PAGE utilizando un gel separador con un grado de entrecruzamiento que va de 4 a 20% T y 1% C (en *gradiente*) de 1 mm de espesor. Todas las soluciones fueron realizadas con agua *MilliQ* y evitando la contaminación por manipulación excesiva. Para la corrida electroforética, se utilizó un equipo de electroforesis vertical (*BioRad*, CA, USA) donde se colocó el *buffer* compuesto por Tris 0,1 mM, tricina 0,1 M y SDS 0,2 % (pH 8,25 a 25 °C) en el compartimiento catódico y un buffer compuesto por Tris-HCl 0,1 mM (pH 8,90 a 25 °C) en el anódico. La corrida electroforética se desarrolló durante 20 min a 90 V y 2 hs 30 min a 110 V, a 10 °C. La coloración del gel se realizó durante 20 min con *Coomassie Blue R* (solución al 0.2% en metanol, agua y ácido acético (20:80:0.5)). Posteriormente, se decoloró el gel con una solución conteniendo metanol, agua y ácido acético (50:50:1).

4.12.3. *Espectrometría de masa*

Las bandas seleccionadas se cortaron con bisturí en trozos de 1 mm² y se colocaron en tubos *eppendorf* estériles. Se realizó una digestión in-gel con tripsina de los fragmentos producto de la proteólisis de la PMCA y luego los péptidos resultantes de la digestión triptica se extrajeron del gel y se analizaron por espectrometría de masa. Como control se procesó una muestra de SAB y una zona de gel sin muestra se utilizó como blanco.

Brevemente, las bandas individuales se destiñeron por incubación con una solución de ácido acético al 12% (v/v) y metanol al 50% (v/v). Luego se lavaron con acetonitrilo para remover reactivos residuales y se llevaron a sequedad en una con un concentrador *Speed Vac* SC 110A. Las muestras se incubaron en presencia de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 100 mM pH 8.00 durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación con iodoacetamida 55 mM pH 8.00. Se realizó la digestión triptica de cada fragmento con tripsina 25 ng/μl durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos obtenidos se extrajeron con ácido fórmico al 5% (v/v) en ácido acético al 50% (v/v). El concentrado, desalado y la purificación cada muestra se realizó con una mini-columna C18 en un *Zip-Tip* (*Millipore*). Los péptidos resultantes de la digestión fueron eluidos de la matriz de la columna con una solución de ácido alfa-cianohidroxicinámico, matriz utilizada para el análisis por espectrometría de masas. Cada muestra se analizó mediante el equipo 4800 MALDI TOF TOF (*Applied Biosystems*). En este instrumento el MALDI se encuentra combinado con dos secciones que miden el “tiempo de vuelo” (TOF) separadas por una cámara de fragmentación. Los datos fueron obtenidos en modo “Reflectrón” y posteriormente se realizó una fragmentación para obtener los espectros MS/MS de las señales más importantes. Los datos fueron analizados manualmente comparando los distintos espectros con los valores de MH⁺ obtenidos por digestión *in silico* de la secuencia de la PMCA.

4.13. Ajuste de Curvas y estimación de parámetros

Cada resultado presentado en esta tesis doctoral es producto de al menos tres experimentos independientes. Las ecuaciones fueron ajustadas a los resultados experimentales mediante un procedimiento de regresión no lineal basado en el algoritmo de Gauss-Newton (217), utilizando el programa comercial *Sigma Plot 10.0*

para Windows. A partir de este, y mediante *Excel*, se obtuvieron los valores de ajuste de los parámetros y sus desvíos estándar. La ecuación que proporcionó el mejor ajuste se seleccionó sobre la base del menor desvío estándar de la regresión. La significación estadística se realizó mediante el test de Student.

4.14. Origen y calidad de las drogas utilizadas

Las drogas que se utilizaron para la preparación de las soluciones y *buffers* fueron adquiridas a Sigma Chemical Co. (St Louis, Missouri, USA). Todas estas drogas fueron de grado pro-análisis.

PARTE III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 5

Actividad de la Bomba de Calcio de Membrana Plasmática reconstituida en micelas mixtas de detergente-fosfolípido

5.1. Introducción

Como mencionamos previamente, las P-ATPasas y otras proteínas integrales de membrana funcionan insertas en una bicapa lipídica. La composición del entorno lipídico es típicamente compleja y dinámica, de manera que permita un funcionamiento óptimo adecuado a los requerimientos de la célula. Además de su función estructural, los lípidos interactúan con las proteínas integrales de membrana mediante: (i) Interacciones de los lípidos con sitios específicos de las proteínas y/o (ii) interacciones de los lípidos con la superficie transmembrana de la proteína en sitios inespecíficos de la misma. En este último caso, la estructura de los fosfolípidos será importante al determinar la conformación de la proteína y por lo tanto, su actividad catalítica y de transporte (15).

Dada la complejidad de las membranas naturales, para su estudio las proteínas integrales se reconstituyen en sistemas micelares (fosfolípido-detergente). En estos sistemas las regiones hidrofóbicas de la proteína están incluidas entre los grupos no polares disponibles en la solución dispersa de lípidos. Ha sido previamente demostrado para la PMCA que su actividad y su estabilidad son influenciadas por los fosfolípidos que la rodean (218). Además, hemos descrito recientemente que el aumento de la fracción molar de un fosfolípido neutro como DPPC en micelas mixtas modula positivamente la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, sin importar la concentración individual de anfífilos en el sistema (219). Por lo tanto, con el objetivo de avanzar en la comprensión de las complejas interacciones que existen en los sistemas micelares de reconstitución de proteínas de membrana, realizamos una serie de experimentos en los cuales la bomba de calcio de membrana plasmática purificada fue reconstituida en micelas mixtas compuestas por el detergente no iónico polioxietilen-10-lauril éter ($\text{C}_{12}\text{E}_{10}$) y por fosfatidilcolina (PC). Este sistema de reconstitución es ampliamente utilizado para evaluar la actividad biológica muchas proteínas integrales de membrana.

En el caso particular de la PMCA, existen pocos estudios que describan la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa con la composición del entorno micelar.

En este capítulo se describen los experimentos realizados con el fin de determinar el efecto del aumento de la fracción molar (X_{PC}) de distintos tipos de fosfatidilcolina en contacto directo con la PMCA. Describiremos como la fracción molar de fosfolípidos y las características de la cadena carbonada modifican la actividad biológica de la PMCA.

5.2. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA depende de la fracción molar de fosfolípidos y de la longitud de la cadena carbonada del fosfolípido

Los estudios fueron realizados utilizando PMCA purificada y deslipidizada, tal como se describe en "*Metodologías*". La enzima que fuera obtenida en micelas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, se incluyó en micelas compuestas por este detergente y moléculas de PC de distinto largo y saturación de cadena carbonada. La concentración de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, en esta serie de experimentos se mantuvo constante y fue de 120 μM . La concentración micelar crítica (CMC) del $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ es aproximadamente 5 μM cuando está puro (220) y se ha descrito que este parámetro disminuye para un anfifilo dado cuando se agrega un segundo componente a las micelas (220). Por otro lado, para los fosfolípidos utilizados la CMC oscila en un rango de 1-10 nM. La composición de la fase micelar la podemos definir por la fracción molar de cualquiera de sus componentes (X_n). En particular, la fracción molar de fosfatidilcolina (X_{PC}) en la micela mixta puede expresarse como:

$$(5.1) \quad X_{\text{PC}} = \frac{n^{\circ} \text{ moles PC}}{n^{\circ} \text{ moles PC} + n^{\circ} \text{ moles C}_{12}\text{E}_{10} + n^{\circ} \text{ moles PMCA}}$$

En esta ecuación consideramos despreciable el número de moles de PMCA ya que se encuentra en una concentración 1000 veces menor respecto al resto de los componentes de la fase micelar. Por lo tanto, realizando la aproximación señalada, la X_{PC} se puede expresar cómo:

$$(5.2) \quad X_{PC} = \frac{n^{\circ} \text{ moles } PC}{n^{\circ} \text{ moles } PC + n^{\circ} \text{ moles } C_{12}E_{10}}$$

De acuerdo con esto, se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la fracción molar de fosfatidilcolina (X_{PC}) en el sistema de reconstitución. Como se detalló previamente la concentración de $C_{12}E_{10}$ se mantuvo constante en todas las condiciones ensayadas y por lo tanto para aumentar la X_{PC} se incrementó en cada punto la concentración de fosfatidilcolina.

La **Figura 5.1 A** muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa obtenida en función de X_{PC} de DLPC, DMPC y DPPC. Por otro lado, la **Figura 5.1 B** muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando se incrementa la X_{PC} de una serie de fosfolípidos monoinsaturados: (di14:1)PC, (di 16:1)PC y DOPC. De la **Figura 5.1** podemos notar que, en principio la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la enzima incluida en micelas de $C_{12}E_{10}$ (es decir, sin fosfolípidos agregados) es mínima. Dicha actividad podría ser causada por la presencia de algunas moléculas de fosfolípidos íntimamente unidas a la enzima, que persistan tras el proceso de purificación y deslipidización (219). Además, la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa con la fracción molar de fosfolípidos (X_{PC}) presenta un comportamiento bifásico para todos las combinaciones fosfolípido-detergente ensayadas (**Figura 5.1 A y B**): la actividad enzimática aumenta con X_{PC} , alcanzando valores máximos, para luego disminuir progresivamente. Sin embargo, si bien el comportamiento general es el mismo, se pueden observar diferencias entre los distintos fosfolípidos ensayados: (a) Los valores máximos de actividad Ca^{2+} -ATPasa son diferentes; (b) La actividad enzimática comienza a descender a distintas X_{PC} .

Como mencionamos previamente, al realizar esta serie de experimentos mantuvimos constante la concentración de $C_{12}E_{10}$ en 120 μ M e incrementamos la concentración de fosfatidilcolina con el objetivo de aumentar en cada condición la X_{PC} . Con este diseño experimental podemos notar que a medida que aumentamos la X_{PC} también está aumentando la concentración total de anfifilos (detergente y fosfolípidos) en el medio de reacción.

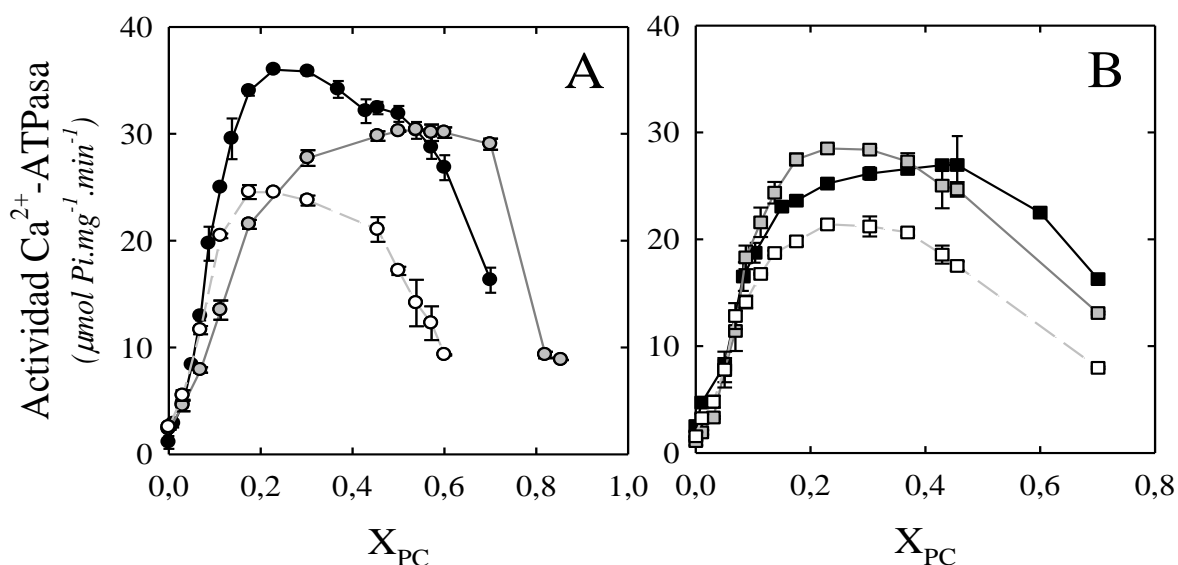


Figura 5.1: Efecto del aumento de la fracción molar de distintos fosfolípidos (X_{PC}) sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. La actividad Ca^{2+} -ATPasa fue determinada mediante el método de Fiske & Subbarow (Sección 4.5.3), en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de (A) $C_{12}E_{10}$ /DMPC (círculos negros), $C_{12}E_{10}$ /DLPC (círculos grises) y $C_{12}E_{10}$ /DPPC (círculos blancos) y (B) en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de $C_{12}E_{10}$ /di(14:1) (cuadrados negros), $C_{12}E_{10}$ /di(16:1) (cuadrados grises) y $C_{12}E_{10}$ /DOPC (cuadrados blancos). La concentración de Ca^{2+} libre en el medio fue de 70 μ M. Los valores mostrados son el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las líneas que unen los puntos permiten una mejor visualización del fenómeno.

Si bien ha sido previamente postulado que la actividad enzimática de la PMCA depende de la fracción molar de fosfolípido o detergente que componen la micela mixta, dada la complejidad del sistema anfifílico, ensayamos una serie de controles diseñados con el objetivo de descartar que el comportamiento observado en la **Figura 5.1** fuera consecuencia del aumento del número de anfífilos totales (**Figura 5.2**). La **Figura 5.2 A** muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la X_{PC} de DMPC y DLPC. La diferencia primordial con los experimentos mostrados en la **Figura 5.1** es que, si bien la X_{PC} aumenta, la concentración de anfífilos totales en el medio de reacción permanece constante. La concentración final de anfífilos totales es de 200 μ M, por lo tanto se aumentó en cada condición la concentración de fosfatidilcolina y se disminuyó la de $C_{12}E_{10}$ para alcanzar la X_{PC} deseada. La concentración mínima de $C_{12}E_{10}$ que se alcanzó fue 70 μ M (teniendo en cuenta siempre estar por encima de la CMC). En esta figura vemos que el comportamiento encontrado es similar al observado en la **Figura 5.1** para los fosfolípidos ensayados.

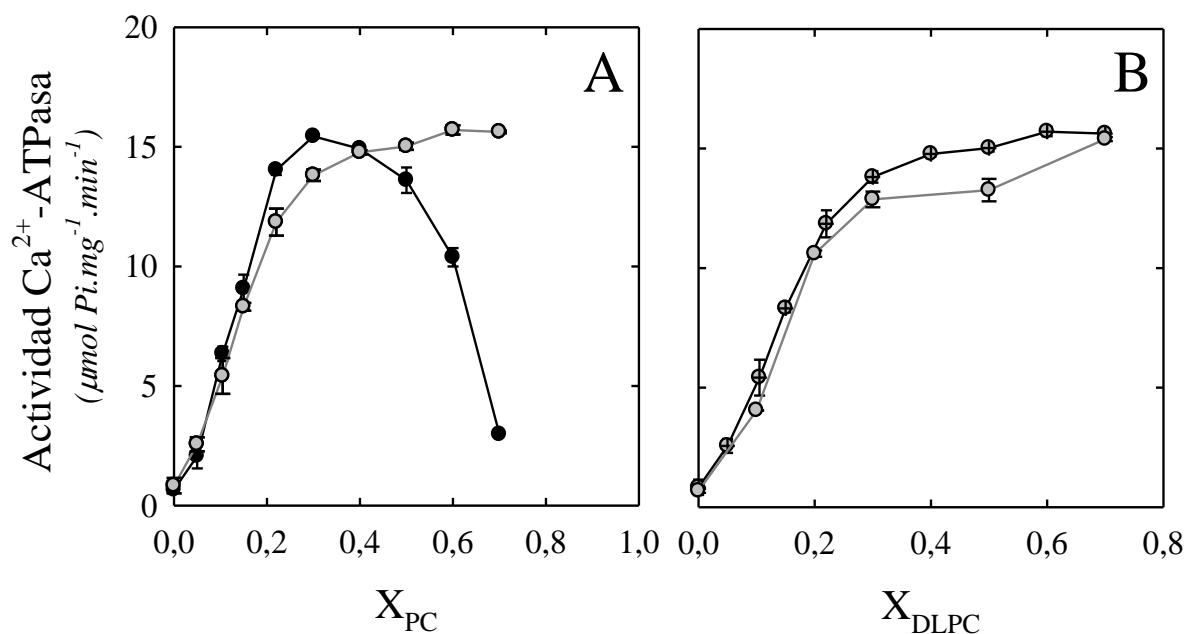


Figura 5.2: Efecto del aumento de la fracción molar de distintos fosfolípidos (X_{PC}) sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA manteniendo constante el número de anfífilos en el sistema. La actividad Ca^{2+} -ATPasa fue determinada mediante el método de Fiske & Subbarrow (Sección 4.5.3), en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de (A) $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC (círculos negros), $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC (círculos grises) manteniendo constante la concentración de anfífilos totales en 200 μM y (B) en presencia de micelas mixtas constituidas por distintas fracciones molares de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC en presencia de una concentración final de 200 μM de anfífilos totales (círculos grises lisos) y 800 μM (círculos grises cruzados). La concentración de Ca^{2+} libre en el medio fue de 70 μM . Los valores mostrados son el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las líneas que unen los puntos fueron incluidas sólo para visualizar la tendencia del fenómeno.

En la **Figura 5.2 B** se observa actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la X_{PC} de DLPC manteniendo constante la cantidad de anfífilos totales en 200 u 800 μM . Podemos ver que ambas curvas presentan un comportamiento similar e incluso la enzima alcanza valores similares de actividad Ca^{2+} -ATPasa. Con este experimento podemos afirmar que el comportamiento bifásico observado en la **Figura 5.1** estaría determinado por el enriquecimiento de fosfatidilcolina en el ambiente inmediato a la proteína (X_{PC}) y no por el número total de anfífilos presentes en el medio de reacción.

5.3. Fase de activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa por fosfolípidos neutros

El comportamiento evidenciado en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en X_{PC} menores a 0.3 (**Figura 5.1**), fue observado previamente en un sistema de

reconstitución particular (C₁₂E₁₀-DPPC)(219). En este trabajo los autores postularon un modelo mecanístico de dos estados, basado en el intercambio entre anfifilos no estructurales en la superficie hidrofóbica transmembrana y un cambio conformacional inducido por lípidos, que explicarían la modulación de la actividad enzimática de una proteína. La **Ecuación 5.3** describe el modelo mínimo propuesto por los autores,

$$(5.3) \quad A = \frac{A_1 - A_0}{1 + e^{-c_x(X - X_{0.5})}} + A_0$$

donde $X_{0.5}$ representa la fracción molar de fosfolípidos que produce la mitad del efecto máximo, c_x es un coeficiente de cooperatividad empírico relacionado con la pendiente máxima de la curva, A_0 y A_1 representan la asíntota inferior y superior de la ecuación, respectivamente. Las líneas punteadas de la **Figura 5.3 A y B** corresponden al ajuste global de la **Ecuación 5.3** a los datos experimentales (de la **Figura 5.1**) entre X_{PC} 0 y 0,3. Como se puede observar, el modelo mínimo describió adecuadamente el comportamiento de nuestros datos, en el rango ensayado, para todos los fosfolípidos utilizados.

En la **Tabla 5.1** se encuentran volcados los parámetros obtenidos mediante el ajuste de la **Ecuación 5.3** a los datos experimentales. Como se vio en la **Sección 5.2**, se obtuvieron niveles máximos de actividad Ca²⁺-ATPasa (A_1) diferentes para cada sistema de reconstitución PC/C₁₂E₁₀ ensayado. La mayor actividad se obtuvo cuando la enzima fue reconstituida en micelas de DMPC/C₁₂E₁₀. Por el contrario, la mínima actividad se obtuvo en presencia de micelas mixtas de DOPC/C₁₂E₁₀. Si nos enfocamos en los fosfolípidos insaturados, el nivel máximo de actividad se observó con (16:1)PC. Estos resultados en conjunto, demuestran que la actividad máxima alcanzada por la PMCA en los distintos sistemas de reconstitución depende de la longitud y el grado de insaturación de la cadena carbonada de cada fosfolípido ensayado. Por otro lado, podemos notar que el parámetro $X_{0.5}$ (X_{PC} que genera la mitad del efecto máximo) fue similar para la mayoría de los fosfolípidos ensayados (**Tabla 5.1**) a excepción de DLPC.

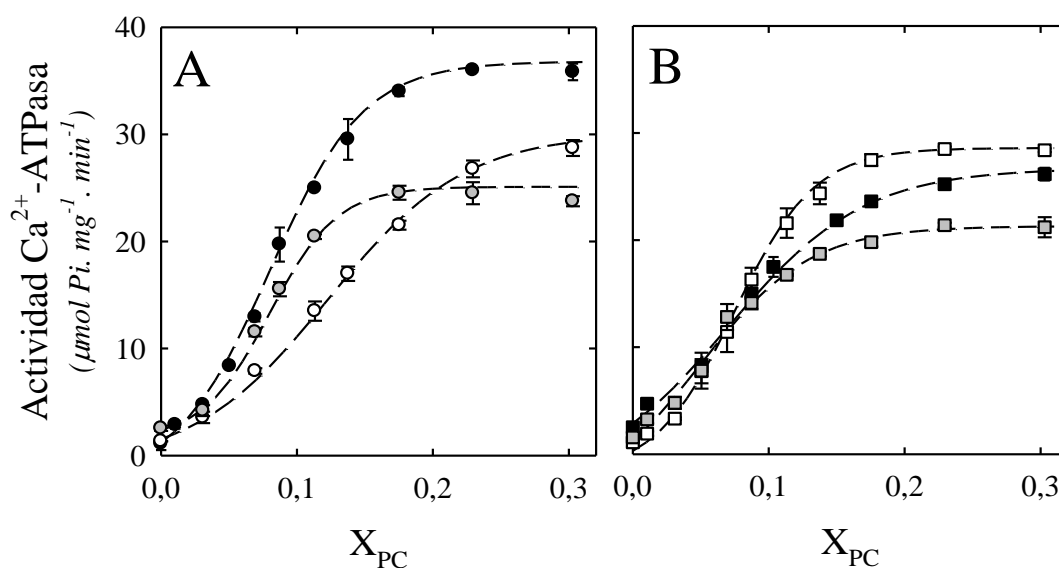


Figura 5.3: Ajuste del modelo de dos estados a la fase de activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. (A) Actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la X_{PC} de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC (círculos negros), $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC (círculos grises) y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DPPC (círculos blancos). (B) Actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la X_{PC} de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /di(14:1) (cuadrados negros), $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /di(16:1) (cuadrados grises) y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DOPC (cuadrados blancos). Las líneas punteadas en A y B corresponden al ajuste de la ecuación 5.3 a los datos experimentales entre X_{PC} 0 y 0,3 para todos los fosfolípidos ensayados. Los mejores parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 5.1. Los valores mostrados son el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

En términos del modelo propuesto por Dodes Traian y col., en presencia de micelas mixtas de DLPC/ $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ se necesitaría una mayor proporción de moléculas de este lípido para alcanzar la cobertura del dominio hidrofóbico transmembrana de la PMCA que permite la máxima activación de la Ca^{2+} -ATPasa. Además, el parámetro c_x alcanza un valor máximo en presencia de DPPC y es mínimo para DLPC y (14:1)PC. Dicho parámetro brinda una estimación combinada de la afinidad de un fosfolípido por la superficie hidrofóbica transmembrana de la proteína y del efecto cooperativo del mismo para activar la enzima (219). Por lo tanto, el valor elevado de c_x observado para DPPC indica que este fosfolípido es un activador más eficiente de la PMCA, es decir, pequeños cambios en su proporción en una micela o en la membrana podría producir cambios significativos en la actividad enzimática. En congruencia con el hecho de que A_0 representa a la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida en $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y en ausencia de fosfolípidos ($X_{\text{PC}} = 0.0$), su valor fue muy similar y cercano a cero ($A_0 = 0.9 \pm 0.5 \mu\text{mol Pi. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) en todas las condiciones ensayadas. Por lo tanto, se expresa

como el promedio del valor de este parámetro en todas las condiciones de reconstitución ensayadas.

Tabla 5.1
Parámetros obtenidos para la PMCA luego de ajustar la Ecuación 5 a los datos experimentales de la Figura 5.3

<i>Fosfolípido</i>	A_I	$X_{0.5}$	c_x
DLPC	30.2 ± 0.5	0.11 ± 0.01	18 ± 1
DMPC	36.0 ± 0.4	0.08 ± 0.01	31 ± 2
DPPC	24.4 ± 0.4	0.07 ± 0.01	41 ± 4
14:1(PC)	26.7 ± 0.3	0.05 ± 0.01	19 ± 2
16:1(PC)	28.4 ± 0.3	0.08 ± 0.01	35 ± 3
DOPC	21.1 ± 0.3	0.06 ± 0.01	27 ± 3

5.4. Discusión

En el presente capítulo estudiamos la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la fracción molar de fosfolípidos. Esta dependencia puede dividirse en dos enfoques: uno de ellos asociado con las características generales del sistema y otro asociado a las características propias de la interacción de la enzima con distintos anfifilos. La dependencia bifásica entre la actividad de la bomba y la X_{PC} se relaciona con las características del sistema de reconstitución, independientemente de las características del fosfolípido utilizado. A pesar de este comportamiento general, la actividad de la enzima para una X_{PC} óptima depende también de las características del fosfolípido que forma la micela.

Por otro lado, estudiamos el efecto de la cadena carbonada de los fosfolípidos neutros que forman la micela sobre lo que llamamos fase de activación (primera parte de la curva de la **Figura 5.1**).

Para obtener información cuantitativa sobre las diferencias observadas, aplicamos un modelo mecanístico (Eq. 5) que relaciona la actividad enzimática con la fracción molar de fosfolípidos. Dicho modelo ha sido capaz de describir nuestros datos

experimentales, hasta $X_{PC} = 0.3$, en todos los sistemas fosfolipídicos ensayados. Sin embargo, para la mayoría de los sistemas fosfolípido-detergente, alrededor de dicha fracción molar se obtuvo una disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, fenómeno que el modelo utilizado no predice. En el caso particular de $C_{12}E_{10}$ -DLPC la caída se observó a partir de $X_{PC}=0.70$, lo cual sugiere que existen diferencias en las características estructurales de dicho fosfolípido o en la forma de la micela que se constituye. En principio vemos que los valores del parámetro A_1 (Tabla 5.1) fueron los que mostraron más diferencias al comparar entre cada sistema de reconstitución ensayado. Por otro lado, con respecto al $X_{0.5}$, observamos que el valor se mantuvo en un rango de 0.07-0.1, lo que indicaría que alrededor de dichas X_{PC} , la proteína alcanza la mitad de la activación por fosfolípidos, independientemente del largo de cadena del mismo o de la presencia de insaturaciones en la misma. El parámetro c_x arrojó un valor distinto para cada fosfolípido ensayado en la reconstitución. Este parámetro está relacionado con la eficacia de cada lípido para promover la activación de la PMCA. Resulta curioso el hecho que en la reconstitución con lípidos saturados, c_x aumentó con el largo de la cadena carbonada, aunque para establecer una relación directa deberíamos ensayar la reconstitución de la PMCA con mayor cantidad de fosfolípidos con distintos largos de cadena.

Es probable que a partir de $X_{PC} = 0.40$, el sistema comience una etapa de transición micela-vesícula, que podría culminar con la formación de algunas vesículas en las que quede inmersa la proteína. Ha sido demostrado por Hao y col. (1994) (107) que la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA es menor cuando se reconstituye en liposomas que en micelas mixtas (fosfolípido-detergente). Sin embargo, esta hipótesis no explicaría el caso de la reconstitución en DLPC. Podríamos pensar que al aumentar la X_{PC} , aumenta la proporción de agregados lipídicos, de los que se excluye a la PMCA, quedando reconstituida en micelas mixtas compuestas mayormente por detergente. Una hipótesis que puede explicar el caso de la reconstitución en DLPC es que dada su corta longitud de cadena, tenga tendencia a permanecer en la fase micelar formando micelas mixtas más estables en el rango ensayado. Para evaluar estas hipótesis y explicar las diferencias halladas en la actividad Ca^{2+} -ATPasa, estudiamos los cambios dinámicos que atraviesa el sistema lípido-detergente cuando se incrementa la X_{PC} .

Capítulo 6

Estudio de la transición micela-vesícula en sistemas detergentes-fosfolípido

6.1. Introducción

En el capítulo previo, demostramos la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la X_{PC} de cada sistema de reconstitución. Observamos un comportamiento bifásico caracterizado por una fase inicial de aumento de la actividad en función del aumento de X_{PC} y luego una disminución de la misma a partir de $X_{\text{PC}} = 0.30-0.40$. Este comportamiento fue similar para la mayoría de los sistemas ensayados (con excepción de DLPC, donde la caída de la actividad se observó en $X_{\text{PC}} = 0.7$).

Ha sido demostrado en muchos sistemas fosfolípido-detergente que ocurre una transición micela-vesícula en un rango de X_{PC} similar al utilizado en nuestros estudios (35,221,222). En dicha transición existen estructuras anfifílicas que se caracterizan por ser heterogéneas, desorganizadas y de composición variable. Estos cambios biofísicos en el sistema de reconstitución de la PMCA (**Figura 5.1**) podrían explicar parcialmente la caída en la actividad Ca^{2+} -ATPasa ya que hipotéticamente: (i) la enzima permanece inserta en una vesícula con el sitio catalítico hacia el exterior permitiendo la acumulación de calcio en el lumen que finalmente inhibe la actividad ATPasa; (ii) la enzima queda inserta en una vesícula con el sitio catalítico hacia el lumen, es decir oculto a sus sustratos; o bien (iii) la enzima podría ser menos estable cuando se reconstituye a altas fracciones molares y por ende se inactiva.

En el presente capítulo nos centraremos en la caracterización de la posible transición micela-vesícula en dos sistemas fosfolípido-detergente representativos para nuestro estudio: DMPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y DLPC- $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$.

Para el estudio de la transición vesícula-micela han sido empleadas diversas técnicas (32,34,221,223). En nuestros estudios se buscó explorar la transición reversa (micela-vesícula) mediante la técnica de dispersión de luz estática. La misma es una técnica sencilla que nos permitió explorar el sistema micelar cuando se produce el aumento de la fracción molar de fosfolípidos (X_{PC}). Se determinó, además, el radio hidrodinámico promedio de las poblaciones de micelas o vesículas presentes mediante

la técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia, FCS (del inglés *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). Esta técnica permite inferir, a partir del análisis de las fluctuaciones en intensidad lumínica que se producen cuando moléculas atraviesan un pequeñísimo volumen de excitación (del orden de 1-10 femtolitros) el tiempo de residencia medio en ese volumen que puede luego relacionarse con el radio hidrodinámico de las partículas fluorescentes.

Por otro lado, con el objetivo de comprobar las hipótesis planteadas, realizamos ensayos de actividad incorporando un ionóforo de calcio para evaluar si la menor actividad observada a valores elevados de X_{PC} fuera el producto de la inclusión de la enzima en vesículas cerradas. Además, determinamos la accesibilidad a los sustratos ATP y Ca^{2+} y estimamos la cantidad de enzima activa en distintos sistemas de reconstitución.

6.2. La dispersión de luz aumenta a medida que se incrementa la X_{PC} del sistema lípido (PC)-detergente ($C_{12}E_{10}$)

La dispersión de luz a una determinada longitud de onda es proporcional al tamaño de las partículas presentes en el sistema (224). La técnica de dispersión de luz estática ha sido ampliamente utilizada para monitorear las transiciones vesícula-micela en diversos sistemas anfifílicos (221).

Con el objetivo de determinar la existencia de una transición en nuestro sistema, y el rango de X_{PC} en el que se produce, se realizaron medidas de dispersión de luz estática a 470 nm en soluciones idénticas a las utilizadas en las medidas de actividad Ca^{2+} -ATPasa pero en ausencia de PMCA. Las medidas fueron realizadas de la manera explicada en la *Sección 4.7.1*. Para tal fin, seleccionamos dos sistemas fosfolípido-detergente dentro de los ensayados: $C_{12}E_{10}$ -DMPC y $C_{12}E_{10}$ -DLPC. El primero se seleccionó como sistema anfifílico ya que su comportamiento es representativo del resto de los sistemas de reconstitución ensayados. Por otro lado, el sistema $C_{12}E_{10}$ -DLPC se eligió dado el comportamiento diferente al observado con el resto de los sistemas de reconstitución mostrados en la **Figura 5.1**. La **Figura 6.1** muestra el incremento de la dispersión de luz estática a 470 nm a partir de $X_{PC} = 0.40$ para ambos sistemas ensayados. Por otro lado, el valor máximo hallado (a $X_{PC} = 0.70$) fue menor en

presencia del sistema compuesto por $C_{12}E_{10}$ -DLPC. De manera adicional, con el objetivo de descartar que el aumento en la dispersión de luz (a 470nm) fuera debido al incremento de la cantidad de anfifilos totales (en este caso, fosfolípidos y detergente), se diseñó un experimento control en el que se reemplazan los moles de fosfolípido agregados, por moles de $C_{12}E_{10}$. Para ello se incrementó progresivamente, y en los mismos niveles que en el experimento original, el número total de partículas en el sistema (compuesto exclusivamente por moléculas de $C_{12}E_{10}$).

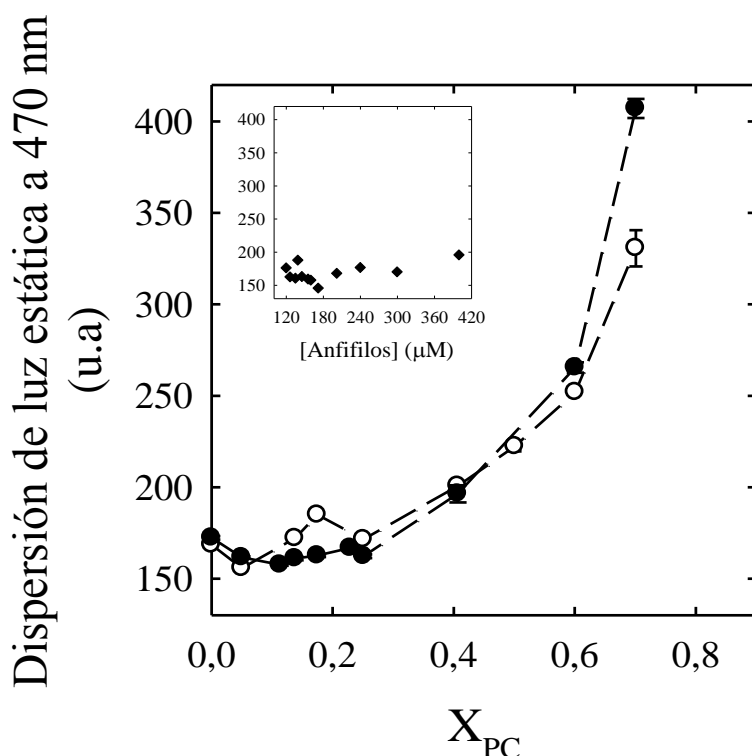


Figura 6.1: Transición micela – vesícula de mezclas de $C_{12}E_{10}/DMPC$ y $C_{12}E_{10}/DLPC$. Dispersión de luz estática a 90° (470 nm) expresada en unidades arbitrarias (u.a.) en función de la X_{PC} de $C_{12}E_{10}/DMPC$ (círculos negros) y $C_{12}E_{10}/DLPC$ (círculos blancos). Las mezclas fueron preparadas en las mismas condiciones en las que se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa en la figura 5.1. No se agregó enzima en la mezcla final. *Inserto*, Dispersión de luz estática a 90° (470 nm) en función de la concentración de $C_{12}E_{10}$ (en ausencia de DMPC o DLPC). Los valores mostrados son el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

En los resultados graficados en la **Figura 6.1 (inserto)** podemos observar que el aumento de la dispersión observado en la **Figura 6.1**, puede ser atribuido a la transición que experimenta el sistema compuesto por DMPC/ $C_{12}E_{10}$ (o DLPC) cuando se aumenta la fracción molar de fosfolípidos. Esto permite descartar que el aumento de la dispersión, sea debido al aumento de la concentración de anfifilos totales.

Estos resultados muestran que está ocurriendo una transición a X_{PC} aproximadamente 0.40 en ambos sistemas. Sin embargo, la forma y/o el tamaño de las partículas presentes en los sistemas a $X_{PC} = 0.70$ fue ligeramente diferente para ambas mezclas.

6.3. Caracterización del sistema fosfolípido/ $C_{12}E_{10}$ mediante la técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

Con el objetivo de caracterizar las diferencias observadas en el tamaño y/o forma de las partículas (**Figura 6.1**) y también para relacionar este fenómeno con la fase de disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa observada a X_{PC} mayores (**Figura 5.1**) utilizamos la técnica de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) (225) en mezclas de $C_{12}E_{10}$ /DLPC y $C_{12}E_{10}$ /DMPC. Como describimos en la *Sección 4.7.2*, FCS es una técnica basada en el análisis de correlación de las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia que generan las partículas fluorescentes mientras atraviesan un volumen de observación pequeño, del orden de pocos femtolitros, determinado mediante un microscopio confocal. El análisis de estas fluctuaciones permitió determinar el coeficiente de difusión (D) de las partículas y luego, mediante la ecuación 4 (*Sección 4.7.2*) obtuvimos el radio hidrodinámico (R_H) promedio de las poblaciones en el sistema anfifílico ensayado.

En condiciones similares a las que se realizaron los experimentos de dispersión de luz (**Sección 6.1**), se midió la intensidad de fluorescencia mediante la técnica de FCS de sistemas compuestos por micelas mixtas de $C_{12}E_{10}$ y DLPC o DMPC. Para tal fin incorporamos un análogo fluorescente de fosfolípido (Rhodamina-DPPE) en los sistemas a analizar. Esto permitió obtener el coeficiente de difusión de cada sistema ya que ese análogo se incorpora a las micelas mixtas.

En el *inserto* de la **Figura 6.2** podemos observar una curva de autocorrelación típica (en este caso para $X_{DMPC}=0.25$). La curva corresponde al ajuste de un modelo de difusión 3D a los datos experimentales (Ecuación 2, *Metodologías*) con la cual se obtuvo el tiempo de residencia característico (τ_D) de las partículas que difundían en el volumen de observación. Este tiempo se relaciona con D (Ecuación 3, *Metodologías*) y finalmente con el R_H de las partículas (Ecuación 4, *Metodologías*). La **Figura 6.2**

muestra que el radio hidrodinámico (R_H) de las partículas comienza a aumentar a partir de $X_{DMPC} = 0.3$ y $X_{DLPC} = 0.6$. Estos resultados están en concordancia con lo evidenciado en el apartado 6.1 y confirman la existencia de una transición micela-vesícula en los rangos de X_{PC} ensayados. En este sentido, es importante destacar que el aumento del tamaño de partícula ocurre a X_{PC} mayores en mezclas de $C_{12}E_{10}/DLPC$. Además, se evidenció un tamaño diferente de partícula a $X_{PC} = 0.70$ para ambas mezclas.

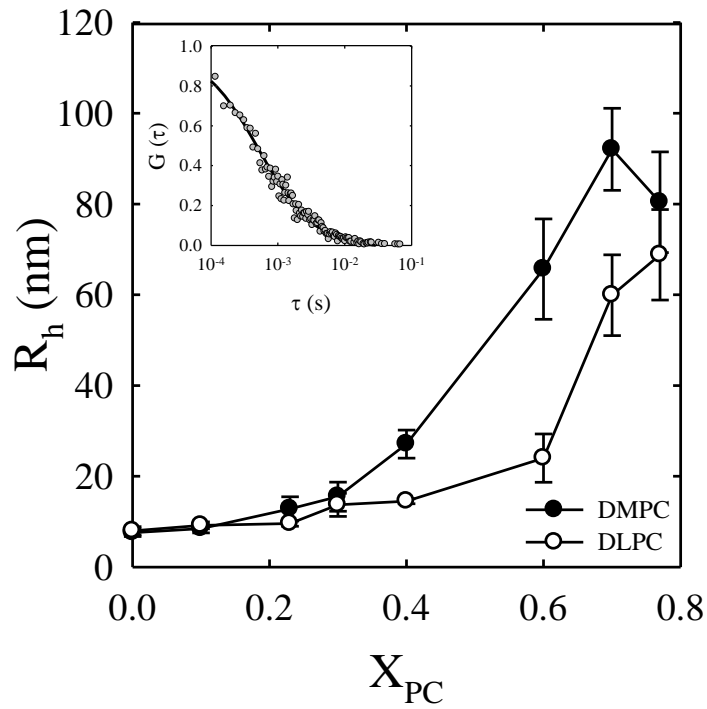


Figura 6.2: Transición micela – vesícula de mezclas de $C_{12}E_{10}/DMPC$ y $C_{12}E_{10}/DLPC$. Radio hidrodinámico (R_H) de la población de especies anfifílicas en función de la X_{DMPC} (círculos negros) y X_{DLPC} (círculos blancos), en las mismas condiciones en las que se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa en la figura 5.1. No se agregó enzima en la mezcla final. *Inserto*, curva de autorrelación obtenida a $X_{DMPC} = 0.25$. Los valores mostrados son el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Los resultados obtenidos para las mezclas de $C_{12}E_{10}/DLPC$, donde el radio hidrodinámico (R_H) de las partículas permanece estable a mayores X_{PC} , son consistentes con los valores de actividad Ca^{2+} -ATPasa determinados en las mismas condiciones experimentales (**Figura 5.1**).

6.4. Efecto de la transición micela-vesícula sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa

Hemos demostrado mediante diferentes técnicas, la existencia de una transición en los rangos de X_{PC} ensayados. Esta transición en el sistema de reconstitución, concuerda con la caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Una posible causa de la disminución de la actividad podría ser la formación de vesículas. Si la PMCA quedara inserta en alguna vesícula, podría hacerlo con el sitio catalítico expuesto a la solución o hacia el lumen de la vesícula. En el caso que el sitio catalítico se encuentre orientado hacia la solución, la enzima ingresaría Ca^{2+} hacia el interior de la vesícula hasta que el gradiente electroquímico detenga el transporte. En el caso contrario, si el sitio catalítico se encontrara orientado hacia el lumen de la vesícula, la enzima no tendría acceso a sus sustratos, el ciclo se detendría y la actividad enzimática disminuiría.

Con el objetivo de evaluar dichas hipótesis, medimos la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituída en mezclas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC en presencia del ionóforo de calcio A23187. Ha sido demostrado que A23187 forma complejos con cationes divalentes y que presenta una elevada afinidad por Ca^{2+} (226). Estos complejos atraviesan las membranas biológicas y permiten la liberación del catión (227). Por lo tanto, si la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa respondía al llenado de vesículas con calcio, la adición de A23187 al sistema, debería revertir la inhibición por acumulación de Ca^{2+} (228). Para ello ensayamos dos X_{DMPC} representativas (0.25 y 0.70, pre y post-transición, respectivamente). La **Figura 6.3** muestra la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituída en $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ o 0.70 en presencia de distintas concentraciones de A23187. La incorporación de un ionóforo de Ca^{2+} no fue capaz de revertir la disminución de la actividad enzimática observada a $X_{\text{DMPC}} = 0.70$. Por otro lado, la leve inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa a $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ al aumentar la concentración de A23187 ha sido descripta para otras proteínas transportadoras de Ca^{2+} y se debe a un efecto inespecífico del ionóforo sobre la enzima (229). Este resultado sugiere que la caída observada en la actividad enzimática de la PMCA luego de la transición micela-vesícula no ocurre a causa de la inserción de la enzima en vesículas y su inactivación por acumulación de Ca^{2+} en su interior.

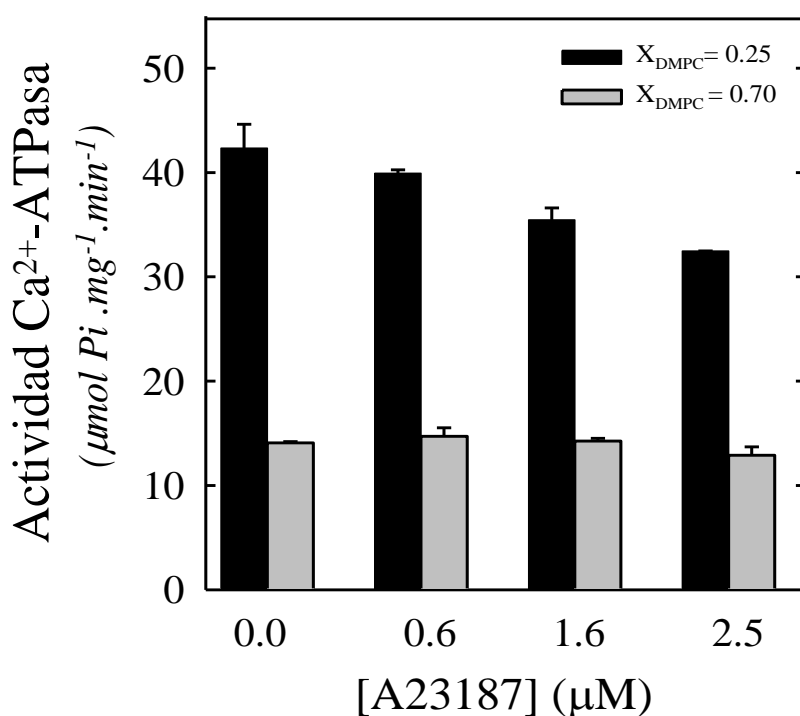


Figura 6.3: Efecto de un ionóforo de Ca^{2+} sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la concentración del ionóforo de Ca^{2+} (A23187 o Calimicina) agregado al medio de reacción. Se determinó la actividad de la PMCA reconstituída en $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC, en las X_{PC} indicadas en la figura, durante 40 min a 37 °C según lo descrito en *Metodologías*. Las barras mostradas son el promedio \pm DS de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

6.5. La cantidad de PMCA activa es similar en sistemas pre y post transición micela-vesícula

Como describimos previamente en la *Sección 2.2.1 (Introducción)*, durante su ciclo de reacción la PMCA forma un intermediario fosforilado ácido estable (*EP*). Por otro lado, el catión Lantano (La^{III}) bloquea el cambio conformacional dependiente de Mg^{2+} de $E_1\text{P}$ a $E_2\text{P}$ (230,231), inhibiendo la actividad enzimática –con una K_i de $3.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ – al producir la acumulación de enzima en $E_1\text{P}$ (110). Por esta razón, la cantidad de *EP* obtenida en presencia de La^{III} es considerada como una medida de la concentración de enzima activa en una preparación (232). Para determinar si la menor actividad Ca^{2+} -ATPasa observada para la reconstitución de la PMCA a X_{PC} mayores (**Figura 5.1**) se debía a una disminución en la cantidad de enzima activa, medimos la concentración total de fosfoenzima con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en presencia de $50 \mu\text{M} \text{La}^{3+}$.

La PMCA fue reconstituida en sistemas de $C_{12}E_{10}$ /DMPC y $C_{12}E_{10}$ /DLPC en fracciones molares óptimas para ambas mezclas (0.25 y 0.40, respectivamente) y en X_{PC} mayores (0.70). La cantidad de fosfoenzima se determinó mediante la cuantificación de la autorradiografía de geles SDS-PAGE de acuerdo a lo descrito en *Metodologías* (Sección 4.6).

La **Figura 6.4** muestra que no existen diferencias significativas entre los niveles de EP en las distintas condiciones ensayadas. Por lo tanto, la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa observada cuando la PMCA se reconstituye en sistemas con X_{PC} mayores no es debida a la disminución de los niveles de enzima funcionalmente activa. Este resultado también descarta la posibilidad de que la disminución de la actividad ocurre por una alteración en la accesibilidad a los sustratos o cofactores ya que el nivel de fosforilado es igual para todas las condiciones.

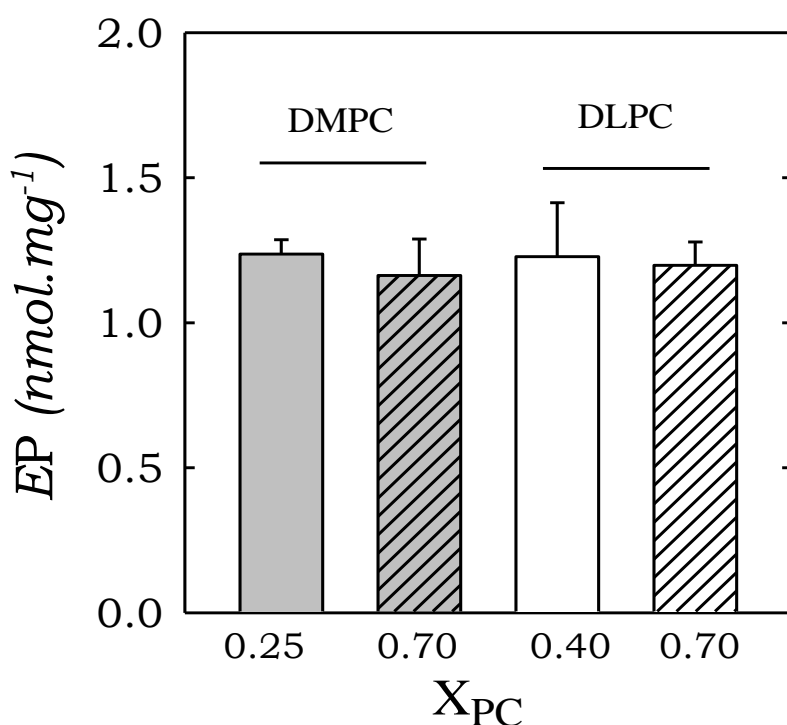


Figura 6.4: Nivel total de EP de la PMCA a X_{DMPC} y X_{DLPC} óptima e inhibitoria de PMCA. La PMCA fue reconstituida en sistemas de $C_{12}E_{10}$ /DMPC y $C_{12}E_{10}$ /DLPC en fracciones molares óptimas para ambas mezclas (0.25 y 0.40, respectivamente) y en X_{PC} mayores (0.70). El nivel total formación de EP desde $[γ^{32}P]ATP$ según se describe en *Metodologías*. Los valores mostrados son un promedio \pm DS de dos experimentos independientes, realizados por triplicado.

6.6. Efecto de la transición micela-vesícula sobre la afinidad por Ca^{2+}

Los experimentos hasta aquí mostrados fueron realizados a una única concentración de Ca^{2+} libre (70 μM). A dicha concentración, la actividad de la PMCA es máxima (233). Por lo tanto, el resultado mostrado en la **Figura 6.4** demuestra que, en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos y cofactores, la cantidad de enzima activa no es significativamente diferente en los distintos sistemas de reconstitución. Sin embargo, debíamos probar que la afinidad por calcio no se modifica por el medio de reconstitución. Para ello, determinamos la afinidad por Ca^{2+} de la PMCA en contacto con distintos sistemas de reconstitución.

En la **Figura 6.5** podemos observar los niveles de actividad Ca^{2+} -ATPasa en función de la concentración de Ca^{2+} libre. La PMCA fue reconstituida en sistemas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}/\text{DMPC}$ en $X_{\text{PC}} = 0.25$ y en $X_{\text{PC}} = 0.70$, es decir, sistemas lípido-detergente pre y post- transición (**Figuras 6.1 y 6.2**). En ambos sistemas, la variación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa puede ser descrita por una hipérbola rectangular:

$$\text{Ecuación 6.1} \quad v = \frac{V_{\max} [\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{Ca}^{2+}} + [\text{Ca}^{2+}]}$$

donde V_{\max} es la actividad Ca^{2+} -ATPasa cuando la concentración de Ca^{2+} tiende a infinito, y $K_{\text{Ca}^{2+}}$ representa la concentración de Ca^{2+} a la cual se obtiene la mitad de la V_{\max} . Los valores de $K_{\text{Ca}^{2+}}$ que brindaron el mejor ajuste a las curvas de actividad Ca^{2+} -ATPasa para $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ y $X_{\text{DMPC}} = 0.70$ fueron $18.0 \pm 1.6 \mu\text{M}$ y $24.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$, respectivamente. Los resultados muestran que, los valores de $K_{0.5}$ obtenidos no son significativamente diferentes para ambos sistemas de reconstitución, indicando que la afinidad aparente por Ca^{2+} es similar en distintos sistemas lípido-detergente pre y post-transición.

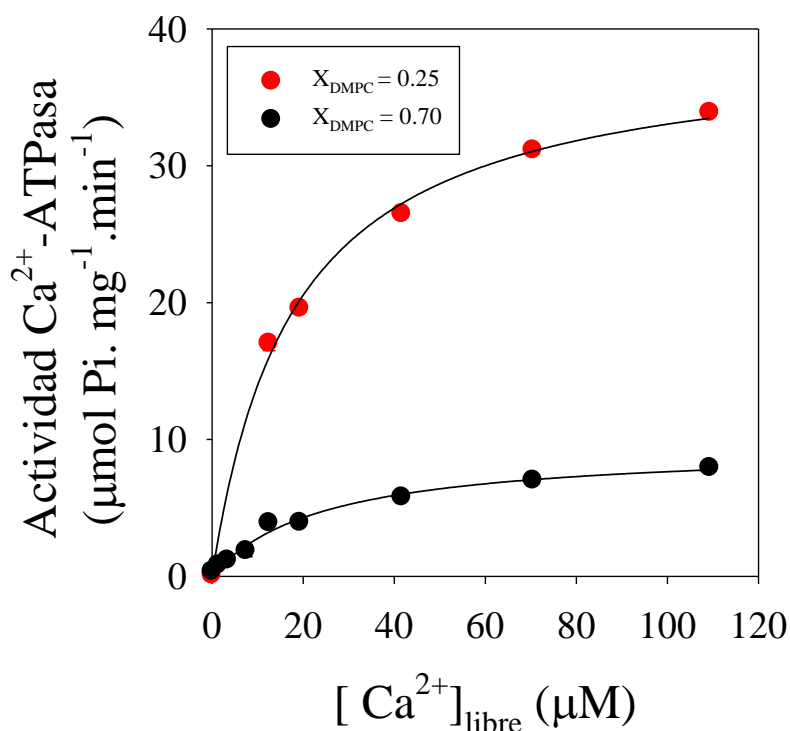


Figura 6.5: Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$. Se determinó la actividad de la PMCA reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC, en las X_{PC} indicadas en la figura y en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} . La figura corresponde a un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error (promedio \pm DS) están representadas y son menores a los símbolos.

6.7. La caída de la actividad Ca^{2+} -ATPasa se produce por una disminución en el número de recambio de la enzima (*turnover*)

En secciones previas del presente capítulo, determinamos que la concentración de enzima activa fue la misma en todas las condiciones ensayadas (**Figura 6.4**) y a su vez determinamos que no existen diferencias en las afinidades aparentes ($K_{0.5}$) para el Ca^{2+} en presencia de dos sistemas distintos de reconstitución (**Figura 6.5**). En enzimología, el *turnover* (también conocido como k_{cat} o número de recambio) de la enzima se define como el número de moléculas de sustrato que una enzima puede convertir en producto por unidad de tiempo y se calcula como el cociente entre la velocidad máxima de la enzima (V_{max}) y la enzima activa total (E_{T}). En el caso de las P-ATPasas este parámetro es equivalente a los ciclos catalíticos completos que realiza la bomba por segundo (234). La enzima total activa (E_{T}), en el caso de la PMCA, es proporcional a los niveles de EP obtenidos en presencia de La^{III} (234).

La **Tabla 6.1** muestra los valores de *turnover* (*kp*) de la PMCA cuando la misma fue reconstituida en sistemas de C₁₂E₁₀/DMPC y C₁₂E₁₀/DLPC a fracciones molares óptimas y posteriores a la transición. Los valores fueron calculados como la relación entre la actividad Ca²⁺-ATPasa obtenida en cada condición detallada (mostrados en la **Figura 5.1**) y los niveles de *EP* máximos obtenidos en presencia de La^{III} de la **Figura 6.4**.

Tabla 6.1

***Turnover* (*kp*) (s⁻¹) de la PMCA en presencia de distintas fracciones molares de fosfolípidos**

X_{PC}	$kp (s^{-1})$
$X_{DMPC} = 0.25$	404 ± 34
$X_{DMPC} = 0.70$	403 ± 17
$X_{DOPC} = 0.25$	474 ± 11
$X_{DOPC} = 0.70$	233 ± 21

Observamos que en presencia de las dos fracciones molares de DLPC ($X_{DLPC} = 0.40$ y 0.70) el *turnover* de la PMCA no es significativamente diferente (404 ± 34 y $403 \pm 17 s^{-1}$). Esto es razonable si pensamos que en ambas condiciones, los niveles de enzima activa son similares (**Figura 6.4**) así como los niveles de actividad (**Figura 5.1**). Por otro lado, existió una marcada disminución del *kp* en presencia de una $X_{DMPC} = 0.70$ con respecto a la $X_{DMPC} = 0.25$. Este resultado, en concordancia con los obtenidos a lo largo de este capítulo, demuestra que la caída en la actividad Ca²⁺-ATPasa observada en la **Figura 5.1** luego de la transición, es producto de un enlentecimiento del tiempo transcurrido para completar un ciclo catalítico completo (disminución en *kp*).

6.8. Discusión

En el presente capítulo demostramos la existencia de una transición en los sistemas fosfolípido-detergente utilizados para la reconstitución de la PMCA. En particular, el radio hidrodinámico (R_H) promedio de las partículas en el sistema anfifílico comienza a aumentar a $X_{DMPC} \approx 0.40$ en sistemas de C₁₂E₁₀/DMPC y a $X_{DLPC} =$

0.60 en presencia de sistemas $C_{12}E_{10}$ /DLPC. Si relacionamos estos resultados con la actividad Ca^{2+} -ATPasa (**Figura 5.1**) vemos que a medida que aumenta el tamaño de las partículas en el sistema, la actividad Ca^{2+} -ATPasa disminuye. Cuando el tamaño de las partículas de $C_{12}E_{10}$ -PC es constante, la actividad de la enzima aumenta conforme aumenta la fracción molar de fosfolípidos. Es un hecho conocido que el tamaño de una micela sólo depende de las características del detergente (235) y en nuestro sistema éste permanece constante hasta que ocurre la transición hacia la formación de vesículas. Nuestros resultados muestran que cuando la proteína se encuentra reconstituida en micelas la actividad Ca^{2+} -ATPasa aumenta y dicho aumento puede ser descrito por el modelo planteado por Dodes Traian y col. (**Ecuación 5.1**).

Por otro lado, luego de la transición el sistema se vuelve heterogéneo y la composición anfifílica, en íntimo contacto con la proteína, puede no ser predecible. En concordancia con esto último, utilizando la técnica de FCS, pudimos determinar que existe un aumento del radio hidrodinámico promedio (y del porcentaje de agregados) de las micelas/vesículas a medida que se incrementa la X_{PC} (**Figura 6.4**).

La disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA luego de la transición podría ocurrir como consecuencia de una pérdida de estabilidad de la bomba en el nuevo entorno y/o a la formación de vesículas cerradas en las que, dependiendo de la ubicación del sitio activo de la enzima, se acumulara Ca^{2+} en su interior o impidieran el contacto de la enzima con los sustratos, disminuyendo así la actividad de la enzima. Sin embargo, descartamos éstas hipótesis ya que la cantidad de enzima activa no disminuye luego de la transición (**Figura 6.4**) y la incorporación de un ionóforo de Ca^{2+} en el sistema no revierte la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa producida por la reconstitución de la enzima a $X_{DMPC}=0.70$ (**Figura 6.3**).

Por otra parte, pudimos demostrar que la caída en la actividad Ca^{2+} -ATPasa observada a fracciones molares posteriores a la transición es producto de una disminución del *turnover* de la enzima (**Tabla 6.1**). Por lo tanto, si bien los sistemas de reconstitución se vuelven más heterogéneos e impredecibles luego de la transición, destacamos que el efecto inhibitorio observado es ejercido sobre el ciclo catalítico de la enzima y no es un artificio asociado a las características biofísicas del sistema. Además, no existieron diferencias significativas entre la afinidad aparente por Ca^{2+} hallada en X_{DMPC} óptima y la hallada en X_{DMPC} post-transición. Este hecho también

refuerza la idea de que la disminución del *turnover* hallada es producto de un efecto sobre alguno de los intermediarios del ciclo catalítico de la enzima.

En este punto, con las evidencias presentadas, podríamos dividir el estudio del comportamiento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en dos secciones: (i) Pre-transición, donde el sistema es homogéneo y compuesto por micelas mixtas cuyo enriquecimiento en fosfolípidos produce un aumento en la actividad de la bomba; (ii) Post-transición, donde el sistema es heterogéneo y el enriquecimiento en fosfolípidos produce la disminución de la actividad de la bomba.

Capítulo 7

Efecto de los fosfolípidos y la estructura lipídica sobre el tiempo de residencia del intermediario fosforilado. Relación estructura-función de la PMCA mediante simulaciones de dinámica molecular

7.1. Introducción

Hemos demostrado que la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de sistemas de reconstitución con diferentes características biofísicas muestra diferencias en el *turnover* de la PMCA. Por otra parte, la actividad de la enzima también depende de las características del fosfolípido que integra la micela mixta ya que la actividad máxima de la PMCA alcanzada en los distintos sistemas fosfolípido-detergente es también diferente en las concentraciones óptimas (**Capítulo 5**).

Durante el ciclo de reacción las P-ATPasas recorren distintos intermediarios. El ciclo de reacción puede verse como la suma de distintas reacciones parciales (*Introducción, Sección 2.2.1*). La modificación del tiempo que la bomba tarda en hacer un ciclo completo puede deberse a la modificación de uno o más pasos de la reacción global. Nuestro siguiente objetivo fue por un lado, determinar si las diferencias observadas en la actividad Ca^{2+} -ATPasa para los diferentes fosfolípidos a X_{PC} óptimas (**Figura 5.1**) eran producto de una disminución del *turnover* de la enzima- tal como sucede luego de la transición micela-vesícula- y por otro lado evaluar si estas disminuciones en el k_p involucran alteraciones de las reacciones parciales de fosforilación ($E_1 \rightarrow E_1P$) o de desfosforilación ($E_2P \rightarrow E_2$). Para los estudios en condiciones óptimas utilizamos DOPC como fosfolípido de referencia ya que en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DOPC la actividad de la PMCA fue menor que en los demás sistemas utilizados. Las reacciones de fosforilación y defosforilación se estudiaron midiendo los niveles de EP de la PMCA en estado estacionario.

Por otra parte, relacionamos la estructura y la función de la enzima mediante simulaciones de dinámica molecular de un modelo de la PMCA incluida en bicapas lipídicas de DMPC o DOPC.

7.2. Efecto de la fracción molar de fosfolípidos y su estructura sobre el tiempo de residencia de la PMCA en el intermediario fosforilado (EP)

Como mencionamos previamente, la PMCA forma un intermediario fosforilado (EP) que se caracteriza por ser ácido estable (236,237). La determinación de los niveles de EP constituye un aspecto importante del estudio de las reacciones parciales del ciclo de la enzima y ha resultado de gran utilidad para caracterizar el mecanismo de acción de los moduladores (19,238). Por otro lado, si bien los fosfolípidos neutros no fueron descritos como moduladores de la PMCA, afectan los niveles de EP en otras P-ATPasas, como la SERCA y la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (15,239,240). Este hecho nos indujo a caracterizar en detalle el mecanismo asociado a los efectos producidos por los fosfolípidos sobre la actividad $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ de la PMCA explorando los niveles de EP en presencia de distintos fosfolípidos y distintas X_{PC} . Se seleccionaron micelas mixtas de DMPC y DOPC como modelos para este experimento, ya que dentro de los sistemas que estudiamos para la reconstitución de la PMCA, en presencia de ellos se generó la máxima y la mínima actividad $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$, respectivamente (**Figura 5.1**).

La PMCA fue reconstituida en sistemas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DOPC en fracciones molares óptimas para ambas mezclas (0.25 y 0.30, respectivamente) y en X_{PC} mayores (0.70 y 0.60, respectivamente). La concentración de fosfoenzima se determinó mediante la cuantificación de la autorradiografía de geles SDS-PAGE de acuerdo a lo descrito en *Metodologías (Sección 4.6)*. Previamente a la determinación de los niveles de EP en las distintas condiciones se comprobó que luego de los 30 s de reacción la enzima se encontraba en estado estacionario.

Los resultados expuestos en la **Figura 7.1 A** muestran que para ambos fosfolípidos, existe un aumento en el nivel de EP en presencia de X_{PC} mayores. Si comparamos los niveles de EP hallados a X_{PC} óptimas para DMPC y DOPC, el nivel alcanzado en presencia de micelas mixtas de DOPC es menor.

Para poder realizar un análisis más profundo del efecto producido por la estructura de los fosfolípidos y la composición del medio que rodea a la proteína, calculamos el tiempo de residencia de la PMCA en el intermediario fosforilado ($t(\text{EP})$). El *tiempo de residencia* ha sido definido como el tiempo que permanece la proteína en un intermediario determinado durante un ciclo aislado de reacción (241). Si el ciclo de

reacción no presenta reacciones accesorias, el tiempo total que le tome a la enzima completar un ciclo será igual a la suma de los tiempos de permanencia en cada intermediario (241).

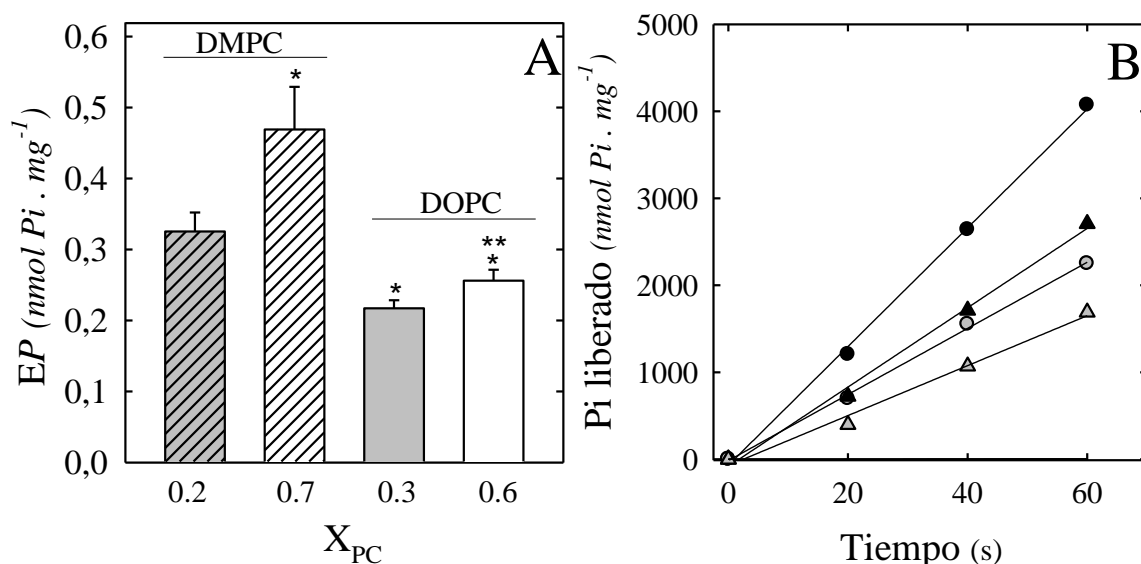


Figura 7.1: Efecto de la reconstitución de la PMCA en mezclas de C₁₂E₁₀/DMPC y C₁₂E₁₀/DOPC sobre los intermediarios fosforilados en estado estacionario. Se reconstituyó a la PMCA en C₁₂E₁₀/DMPC (X_{DMPC} 0.25 o 0.70) y C₁₂E₁₀/DOPC (X_{DOPC} 0.30 y 0.60). Los niveles de EP (A) se determinaron en las mismas condiciones experimentales en las que se determinó la actividad Ca²⁺-ATPasa en la Fig. 5.1, pero la concentración de ATP fue 30 μ M. B, la actividad Ca²⁺-ATPasa en cada condición (círculos negros y grises, DMPC 0.25 y 0.70; triángulos negros y grises, DOPC 0.30 y 0.60) se calculó con la pendiente de la curva del gráfico. Dicha actividad fue determinada en las mismas condiciones explicitadas para A. Los valores mostrados son el promedio \pm DS de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. (*, p 0.0001 con respecto a X_{DMPC} = 0.25; **, p 0.05 con respecto a X_{DOPC} = 0.3).

En particular, el tiempo de residencia de la PMCA en EP ($t(EP)$) será el tiempo que permanece la enzima en el intermediario fosforilado en un ciclo de reacción (241). Para el cálculo del $t(EP)$ necesitamos determinar la actividad Ca²⁺-ATPasa en las mismas condiciones que se realizan los experimentos de fosforilación de la **Figura 7.1 A**: 30 μ M ATP y 25 °C. En la **Figura 7.1 B** se observa el número de nanomoles de fosfato (Pi) liberados por mg de PMCA en función del tiempo de reacción. La actividad Ca²⁺-ATPasa está representada por la pendiente de cada curva y los valores obtenidos para cada condición se encuentran en la **Tabla 7.1**. La **Ecuación 7.1** muestra la forma de cálculo del $t(EP)$:

Ecuación 7.1

$$t(EP) = \frac{[EP]}{V_{\max}}$$

Como vemos, existe una disminución en la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de X_{PC} mayores (0.70 y 0.60 de DMPC y DOPC, respectivamente). Esta caída es similar a la observada en la **Figura 5.1** a una concentración de ATP 2 mM. Además, la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de $X_{\text{DOPC}} = 0.30$ es aproximadamente un 40% menor que la obtenida con $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ y esto se asemeja a las diferencias obtenidas en la **Figura 5.1**. Estos resultados indican que los efectos que produce la reconstitución en distintos sistemas lípido-detergente sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa son independientes de las concentraciones de ATP.

Tabla 7.1

Tiempo de residencia de la PMCA en EP ($t(EP)$) en presencia de distintos sistemas de reconstitución

X_{PC}	$[EP]$ ($\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Actividad específica ($\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$t(EP)$ (ms)
$X_{\text{DMPC}} = 0.25$	0.33 ± 0.03	68.2 ± 1.9	4.5 ± 0.2
$X_{\text{DMPC}} = 0.70$	0.47 ± 0.06	38.0 ± 1.1	11.9 ± 0.8
$X_{\text{DOPC}} = 0.30$	0.22 ± 0.01	45.6 ± 2.3	4.7 ± 0.1
$X_{\text{DOPC}} = 0.60$	0.26 ± 0.01	28.7 ± 2.1	7.9 ± 0.2

En la **Tabla 7.1** encontramos valores de $t(EP)$ que fueron calculados como la relación entre los niveles de EP (**Figura 7.1 A**) y la actividad Ca^{2+} -ATPasa (**Figura 7.1 B**). El $t(EP)$ de la PMCA aumenta en presencia de $X_{\text{DMPC}} = 0.70$ y $X_{\text{DOPC}} = 0.60$ con respecto a la reconstitución en presencia de X_{PC} óptimas. Los efectos sobre este parámetro son en parte debidos a un incremento en los niveles de EP (con respecto a los niveles observados a X_{PC} óptimas). Esto último puede ser a causa de un aumento en la velocidad de formación de EP (mayor velocidad de fosforilación) o alternatively debido a la disminución en la velocidad de desfosforilación. Como comprobamos previamente, la velocidad del ciclo completo de la bomba está disminuida en presencia

de estos sistemas de reconstitución (**Tabla 6.1**), y dado dicha velocidad es medida mediante la hidrólisis de ATP en el tiempo, es muy probable que el efecto del aumento de X_{PC} sobre los niveles de EP sea debido a una menor velocidad de desfosforilación. Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre los $t(EP)$ obtenidos en presencia de X_{PC} óptimas para ambos fosfolípidos. Este resultado sugiere que la cinética más lenta ($k_p = 274 \pm 19 \text{ s}^{-1}$ comparada con $474 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ en $X_{DMPC} = 0.25$) observada en presencia de DOPC a $X_{PC} = 0.30$ (óptima) no es debido a un efecto sobre los intermediarios fosforilados sino sobre algún otro paso del ciclo de reacción.

7.3. Simulaciones de Dinámica Molecular de la PMCA incluida en bicapas de DMPC y DOPC

Con el fin de modelar el fenómeno experimental que describa el incremento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA alcanzada en presencia de micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DMPC, a X_{PC} óptimas, con respecto a la reconstitución en $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DOPC (**Figura 5.1**), expusimos a la PMCA a distintos ambientes anfifílicos y dejamos evolucionar el sistema mediante simulaciones de dinámica molecular (*Metodologías, Sección 4.8*). Hasta el momento, no se cuenta con la estructura tridimensional de la PMCA, por lo tanto utilizamos un modelo de esta ATPasa recientemente propuesto por Penniston y col. (150) que está basado en una estructura cristalográfica de la SERCA (Código PDB 1T5S).

La **Figura 7.2 A** muestra el modelo de la estructura de la proteína junto las posiciones promedio de los átomos de fósforo de las cabezas polares de los fosfolípidos en los extremos de la bicapa (representada por una superficie amarilla). En dicha figura, podemos ver el resultado de la simulación cuando se incluye al modelo de la PMCA en bicapas de DMPC (*Izquierda*) o DOPC (*Derecha*). Se estimó que el grosor hidrofóbico de las bicapas utilizadas fue de 24 y 29 Å, respectivamente. El sistema completo evolucionó a lo largo de la simulación y como vemos en la **Figura 7.2 A**, las capas superiores de las bicapas de DMPC y DOPC se ubican de tal manera que interactúan con las cargas positivas de los residuos de Lys y Arg (representados como esferas en *violeta* y *azul*, respectivamente). Sin embargo, la capa inferior de la bicapa de DOPC (**Figura 7.2 A, derecha**) deja varios grupos cargados positivamente dentro del

núcleo hidrofóbico como ser los residuos pertenecientes a Arg-80, Lys-365, Lys-828, Lys-897 y Lys-974. En cambio, en la bicapa compuesta de moléculas de DMPC estos residuos se encuentran ubicados en un ambiente mucho más polar interactuando con grupos fosfato o bien expuestos al solvente.

En la **Figura 7.2 B** podemos ver un gráfico de las densidades de las cabezas polares y las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos en las distintas zonas que constituyen la bicapa lipídica. Es posible observar que no existen diferencias significativas entre las densidades halladas para las colas hidrofóbicas de DMPC y DOPC (*líneas punteadas*). Sin embargo, únicamente en la bicapa de DOPC existe una disminución en la densidad de las cabezas polares sólo en el lado que correspondería a la porción extracelular (*línea llena, gris*). Este fenómeno se vio asociado a una disrupción de la membrana necesaria para optimizar las interacciones membrana – proteína. De esta manera, las cabezas polares en la bicapa de DMPC se presentaron correctamente empaquetadas y no así las presentes en la bicapa de DOPC.

7.4. Discusión

En este capítulo demostramos que el mecanismo por el cual los fosfolípidos neutros afectan la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA difiere según la X_{PC} utilizada en la reconstitución de la enzima. Además, mediante experimentos de dinámica molecular, propusimos una hipótesis estructural para explicar las diferencias en la actividad Ca^{2+} -ATPasa que no podían ser solventadas por efectos sobre los intermediarios fosforilados.

En principio, la disminución del *turnover* de la enzima observada a X_{PC} mayores (post-transición) parece ser producto de un aumento del $t(\text{EP})$, lo cual sugiere una disminución en la velocidad de desfosforilación. Por otro lado, cuando la PMCA se reconstituye en micelas mixtas de DMPC o DOPC a X_{PC} óptimas (pre- transición) el parámetro $t(\text{EP})$ es similar en ambos sistemas, aun cuando los niveles de actividad Ca^{2+} -ATPasa son significativamente diferentes en presencia de cada uno de estos fosfolípidos a estas fracciones molares (**Figura 5.1**).

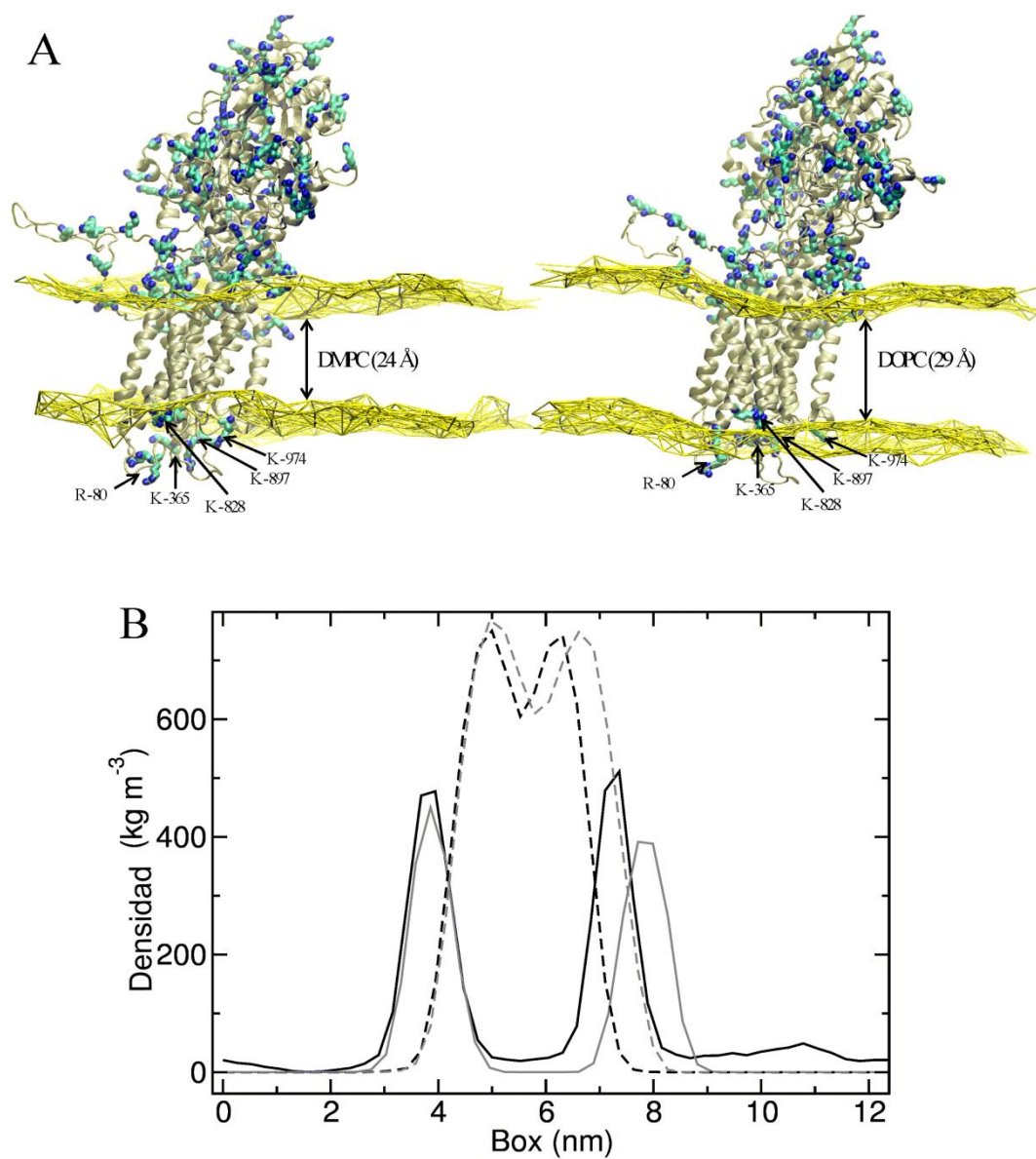


Figura 7.2: Esquema obtenido a partir de simulaciones de dinámica molecular de la PMCA inserta en bicapas de DMPC y DOPC. A, estructura de la PMCA en conjunto con una superficie *amarilla* representando las posiciones promedio de los átomos de fósforo en las bicapas de DMPC (*izquierda*) o DOPC (*derecha*). Los residuos de lisina (K) y arginina (R) se muestran como esferas color *cian* y *azul*. Las flechas muestran los residuos de Arg-80, Lys-365, Lys-828, Lys-897 y Lys-974, localizados en el dominio extracelular de la PMCA. B, gráfico de densidades de las cabezas polares y colas hidrofóbicas. Las cabezas polares de DMPC (negras) y DOPC (grises) se muestran en *líneas continuas* y las colas hidrofóbicas en *líneas punteadas*.

Ha sido previamente demostrado para la SERCA reconstituida en bicapas de diferentes fosfolípidos, que los diferentes niveles de actividad ATPasa alcanzados son producto de los cambios en las velocidades de fosforilación y desfosforilación (242). Sin embargo, a pesar de que la PMCA pertenece a la misma familia de proteínas y en consecuencia tiene una alta similitud, nuestros resultados sugieren que la velocidad de fosforilación y desfosforilación no serían los pasos del ciclo de reacción afectados cuando la bomba es reconstituida en micelas a una X_{PC} óptima.

La realización de simulaciones de dinámica molecular, mediante un modelo estructural de la PMCA incluida en bicapas de DMPC o DOPC, permitió analizar los cambios estructurales que podrían ocurrir en la PMCA. Pudimos mostrar el ocultamiento de varios residuos cargados positivamente en el *núcleo* hidrofóbico de las bicapas de DOPC. Es importante aclarar que, a diferencia de los experimentos de dinámica molecular aquí discutidos, todo el resto de nuestro estudio fue realizado en presencia de moléculas de detergente. Con respecto a esta diferencia, ha sido demostrado que en bicapas compuestas por $C_{12}E_8$ y DOPC (en una X_{PC} de 0.30, aproximadamente) las moléculas de $C_{12}E_{10}$ incrementarían la fluidez de la bicapa con respecto a la ausencia de las mismas, pero no cambian significativamente el grosor hidrofóbico de la misma (243). Este hecho sugiere que la menor actividad Ca^{2+} -ATPasa encontrada en presencia de $X_{DOPC} = 0.30$ (**Figura 5.1**) podría ser el producto de la ubicación de los mencionados residuos (**Figura 7.1**) en un ambiente estrictamente no polar, con un alto costo termodinámico. En cambio, en presencia de bicapas de DMPC, de un menor grosor hidrofóbico, demostramos que los requerimientos estructurales son termodinámicamente favorables ya que no se encontraron residuos cargados en un ambiente no polar. Este efecto también se puede hacer extensivo a X_{PC} mayores (si comparamos $X_{PC} = 0.60$ de DMPC y DOPC) donde la actividad Ca^{2+} -ATPasa es menor en DOPC (**Figura 5.1**). Por lo tanto, en presencia de X_{DOPC} mayores, el menor *turnover* sería no sólo producto de un aumento en $t(EP)$ (**Tabla 7.1**) sino también a un desajuste (*mismatch*) hidrofóbico (*Introducción, Sección 1.3*) generado por una bicapa de mayor grosor.

Capítulo 8

Modulación de la PMCA por ácidos grasos insaturados: Empleo de un análogo fotoactivable de ácido oleico

8.1. Introducción

En los capítulos anteriores demostramos que los fosfolípidos neutros modulan la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. Dicha modulación depende de la composición de la micela mixta (X_{PC}) y de las características de las moléculas de los fosfolípidos.

Como hemos mencionado, la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA es regulada por los fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina o el fosfatidilinositol (112) además de los ácidos grasos insaturados como el ácido oleico (111,158) o el araquidónico (156). En el caso de los fosfolípidos ácidos, numerosos autores han propuesto que ejercen su acción a través de distintos sitios de la proteína (68,111,123,146). En cambio, para la modulación ejercida por los ácidos grasos insaturados libres (AGI libres) sobre la actividad de la PMCA no existen aún estudios detallados que propongan posible(s) sitio(s) de interacción (199). Por otra parte, los ácidos grasos libres ejercen diversos efectos biológicos a través de diferentes vías de señalización en las que se involucran proteínas integrales de membrana, aunque los mecanismos específicos de estos efectos aún son poco precisos (157).

En nuestro laboratorio hemos diseñado un análogo fotoactivable de ácido oleico (AS86) con el objetivo de hallar el o los sitios de interacción de este modulador en la PMCA (199). En este capítulo describiremos las características del AS86 procurando sentar las bases metodológicas que utilizaremos en los experimentos que involucren el uso del reactivo para el estudio de las interacciones con la PMCA.

El primero de los objetivos fue determinar el efecto del AS86 sobre la PMCA purificada reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ / DMPC a $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ y su comparación con el ácido oleico. Por otra parte, compararemos la conformación del dominio transmembrana de la PMCA en presencia de AS86 o ácido oleico. Por último, propondremos la(s) zona(s) de interacción del AS86 con la PMCA.

8.2. Caracterización del AS86

Para caracterizar el AS86 en experimentos de fotomarcación, se analizó el comportamiento fotoquímico del reactivo. En principio, realizamos barridos espectrales del reactivo disuelto en *buffer* MOPS 30 mM (pH = 7.4 a 25 °C) con DMSO como vehículo luego de distintos tiempos de fotólisis a 254nm (para detalles ver “Metodologías” Sección 4.10). En la **Figura 8.1** (*Izquierda*) observamos el espectro de absorción del AS86 obtenido luego de cada tiempo de fotólisis. La curva *negra* (pico mayoritario a 251 nm) corresponde al espectro obtenido sin fotólisis previa del reactivo a 254 nm. A medida que aumenta el tiempo de fotólisis a 254 nm disminuye la absorbancia del pico máximo a 251 nm y aumenta la absorbancia en la zona de 280 a 400 nm.

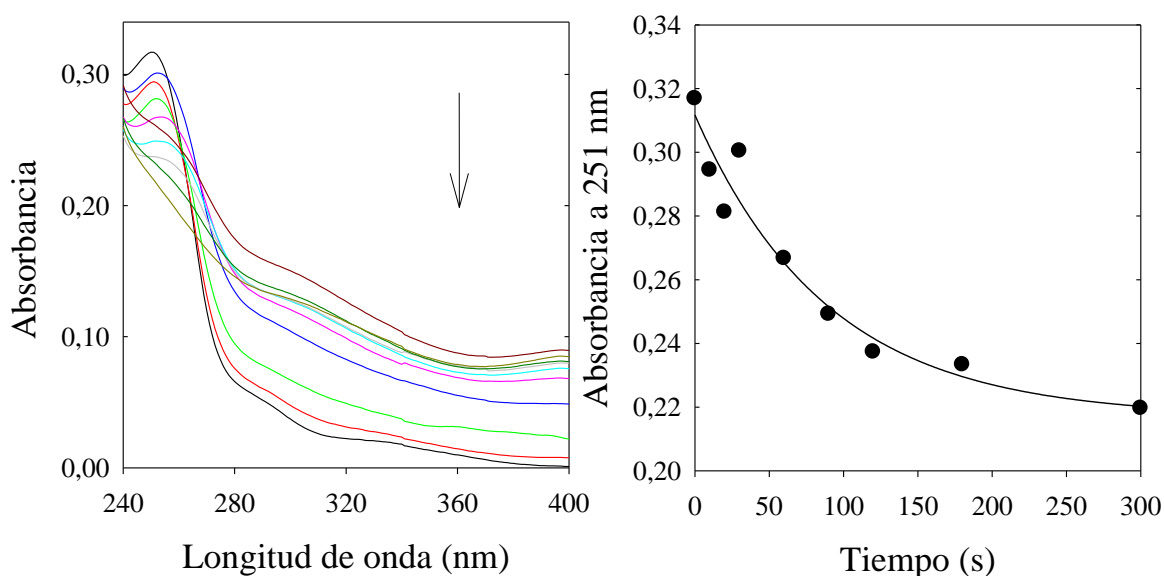


Figura 8.1: Fotólisis del AS86 en *buffer*. *Izquierda*, espectros de absorción del AS86 de 240 a 400 nm obtenidos luego de distintos tiempos de fotólisis (en el sentido de la flecha negra 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 s de fotólisis). *Derecha*, disminución del pico máximo de absorción del AS86 a 251 nm en función del tiempo de fotólisis.

La disminución de la absorbancia del pico máximo a 251 nm, correspondiente al grupo azido presente en el AS86, se graficó en la **Figura 8.1** (*derecha*) en función del tiempo de irradiación a 254 nm. En concordancia con lo hallado por Rossi y col.(199), el mejor ajuste a los datos experimentales es una función exponencial decreciente más una constante:

Ecuación 8.1
$$A = A_{\infty} + A_1 \cdot e^{-kt}$$

Donde A es el valor de absorbancia a 251 nm, A_{∞} es la absorbancia a 251 nm a tiempo infinito, A_1 es la diferencia entre los valores de absorbancia a 251 nm a $t=0$ y $t=t_{\infty}$ y k es la constante aparente de velocidad para el decaimiento de la absorbancia a 251 nm. Los valores de los parámetros de la **Ecuación 8.1** que brindaron el mejor ajuste a los resultados experimentales se muestran en la **Tabla 8.1**. Es necesario aclarar que los valores obtenidos dependen de las condiciones de fotólisis del reactivo, como la distancia, la intensidad de irradiación, entre otras.

Tabla 8.1

Valores de los parámetros de la ecuación 8.1

Parámetros	Valor \pm DS	Unidades
A_{∞}	0.2170 ± 0.0110	-
A_1	0.0948 ± 0.0109	-
k	0.0112 ± 0.0035	s^{-1}

A partir del valor de k calculamos el tiempo medio de fotólisis ($t_{1/2} = \ln 2/k$) obteniendo un valor de 61.9 ± 19.3 s.

En base al valor del $t_{1/2}$ obtenido en este experimento, determinamos que el tiempo de fotólisis fue de 3 min (aproximadamente $3 t_{1/2}$) en todos los experimentos que incluían la fotomarcación con el AS86. Si mantenemos las mismas condiciones de fotólisis, este tiempo de irradiación es suficiente para que la mayor parte del reactivo interactúe y se una covalentemente con determinados grupos químicos de la proteína. Como mencionamos previamente (*Introducción, Sección 1.2.3*) las azidas orgánicas pueden interactuar de manera diferente según las condiciones a las que se las someta. En particular, los nitrenos que se forman luego de la fotoactivación de las azidas reaccionan con centros ricos en electrones (como ser nitrógeno, azufre y otros heteroátomos) (48).

8.3. Modulación de la actividad de la PMCA por ácido oleico: Comparación con el efecto ejercido por el AS86

Estos experimentos se realizaron para mostrar la capacidad del AS86 de modular la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA de manera similar al ácido oleico. El experimento que involucra al reactivo se realiza bajo luz roja para evitar la fotoactivación del grupo azido presente en la molécula. Para ello, ensayamos el efecto del AS86 mediante su interacción *no covalente* con la PMCA purificada reconstituida en micelas mixtas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC ($X_{\text{DMPC}} = 0.25$).

En la **Figura 8.2 A** se observa el porcentaje de activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (tomando como 100% la actividad en ausencia de AS86) en función de la concentración de AS86. La **Figura 8.2 B** muestra una curva similar utilizando concentraciones crecientes de ácido oleico. Si bien las proporciones tanto de AS86 como de ácido oleico se encuentran expresadas en micromoles /litro, es importante aclarar que los rangos de fracciones molares ensayadas van desde 0 a 0.20 aproximadamente, considerando el número de moles de DMPC y $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ presentes en la micela.

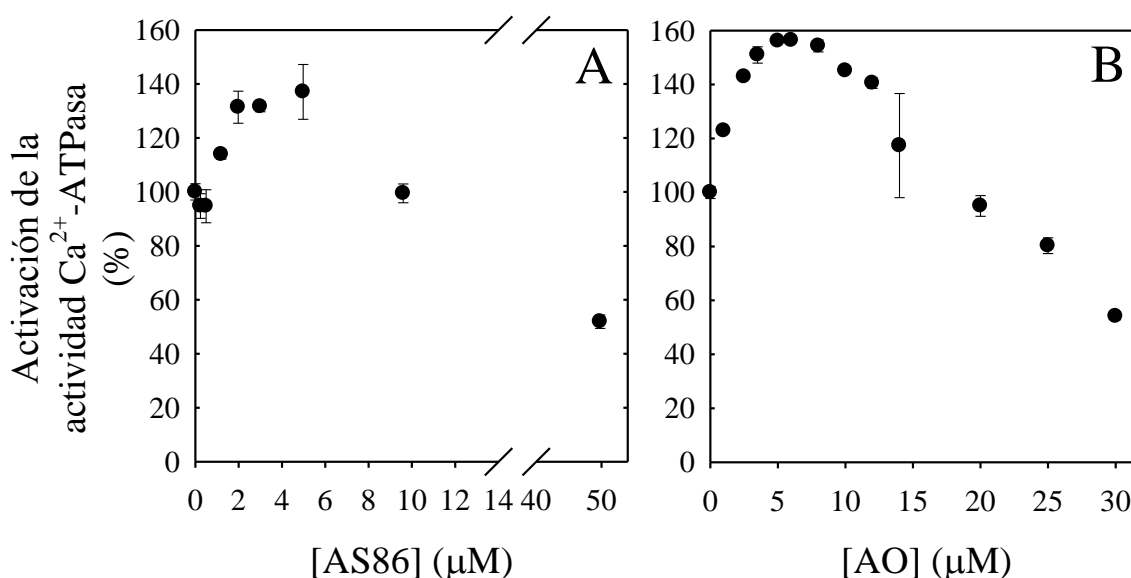


Figura 8.2: Activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en función de la concentración de AS86 (A) o ácido oleico (B). La actividad Ca^{2+} -ATPasa se determinó según *Metodologías* (Sección 4.5.2). La concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ es de $5 \mu\text{M}$ (seleccionada en base la capacidad de los AGI de aumentar la afinidad por Ca^{2+} y la V_{max} . Ver *Introducción*, Sección 2.2.4) y la de ATP es de 2 mM . Los datos graficados son el promedio \pm DS (*barras de error*) de 2 experimentos independientes con cada condición por triplicado.

En la **Figura 8.2 A** observamos que la activación de la Ca^{2+} -ATPasa aumenta con la concentración de AS86 hasta el rango de 4 a 6 μM , a partir del cual comienza a decaer. La **Figura 8.2 B** muestra un comportamiento similar al hallado en presencia del ácido oleico, con un máximo alrededor de 5 a 6 μM para luego caer. El ácido oleico aumenta la actividad de la PMCA en un 55% aproximadamente, mientras que el análogo lo hace en el orden de un 40%.

8.4. Efecto de la unión covalente del AS86 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia y ausencia de CaM.

Como parte de la caracterización de los efectos ejercidos por el AS86 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida en micelas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC estudiamos el efecto de la unión covalente del reactivo luego de la fotólisis a 254 nm sobre la actividad y la modulación por calmodulina (CaM), uno de los principales activadores de la enzima.

El diseño de este experimento se detallada en *Metodologías (Secciones 4.5.2 y 4.10.1)*. Brevemente, se incubó la PMCA reconstituida en micelas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC ($X_{\text{DMPC}} = 0.23$) en presencia de Ca^{2+} o Ca^{2+} -CaM y se agregan distintas concentraciones de AS86. Luego, se fotolisa a 254 nm en condiciones estándar descritas en la **Figura 8.1**. La X_{AS86} , se ensayó en el rango de 0 a 0.50 al momento de fotolisar y posteriormente se diluyó unas diez veces al momento de realizar la medida de actividad (para anular los efectos de la modulación no covalente del AS86 residual).

En el inserto de la **Figura 8.3** se muestran los resultados del control de fotólisis a 254 nm de la PMCA. La actividad Ca^{2+} -ATPasa permanece constante a medida que transcurre el tiempo de fotólisis a 254 nm. Este último control fue necesario dado que la irradiación a 254 nm podría ser deletérea para la proteína lo que se traduciría en un efecto inhibitorio de la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

En la **Figura 8.3** se observa la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en presencia y ausencia de CaM en función de la concentración de AS86. Podemos observar que, en presencia de Ca^{2+} , los niveles de Ca^{2+} -ATPasa no se ven modificados cuando se agregan concentraciones crecientes de AS86. Sin embargo, en presencia del complejo Ca^{2+} -CaM

se observa que la activación de la PMCA por CaM disminuye a medida que aumenta la concentración de AS86.

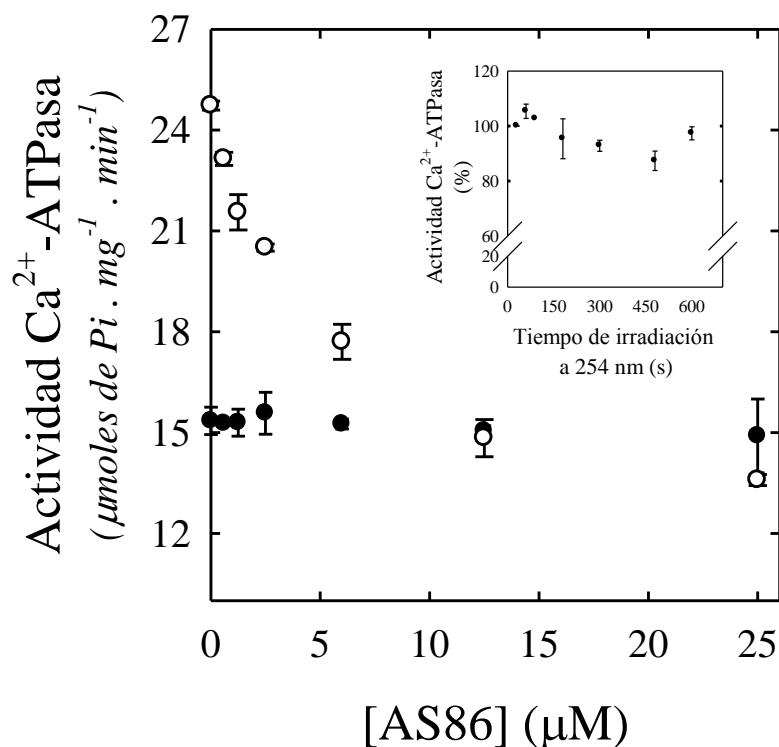


Figura 8.3: Actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en presencia (círculos blancos) y ausencia de CaM (círculos negros) en función de la concentración de AS86 después de la fotólisis a 254 nm. Se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA por el método de Fiske y Subbarrow (Metodologías, Sección 4.5.3) en presencia de $[\text{ATP}] = 2 \text{ mM}$. La concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ fue de $5 \mu\text{M}$. La actividad se determinó en presencia de 120 nM de CaM (círculos blancos) y en su ausencia (círculos negros). Se utilizó una concentración $120 \mu\text{M}$ de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ y $35 \mu\text{M}$ de DMPC ($X_{\text{DMPC}} = 0.25$). Los valores mostrados son el promedio \pm DS de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

8.5. Área accesible a los lípidos en la PMCA en presencia de AS86: efecto de la unión covalente y no covalente

En el laboratorio hemos utilizado un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina, el 1-palmitoil-2-[9-[2'- ^{125}I] iodo-4'-(trifluorometildiazirínil)-benzoxycarbonil]-nonaoil]-sn-glicerol-3-fosfocolina (Figura 8.4), al cual denominamos ^{125}I TID-PC/16, para detectar cambios conformacionales que ocurren a nivel de los segmentos transmembrana de la PMCA y de otras P-ATPasas (66,68,233).

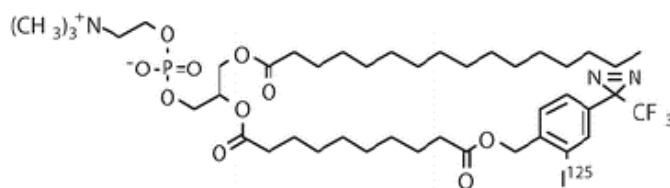


Figura 8.4: Esquema de la estructura del 1-palmitoil-2-[9-[2'-[¹²⁵I]iodo-4'-(trifluorometildiazirinil)-benzoxicarbonil]-nonaoil]-sn-glicero-3-fosfocolina ([¹²⁵I]TID-PC/16).

La molécula es un análogo de fosfatidilcolina (PC) que incluye en su estructura el grupo fotoactivable diazirina y un átomo de ¹²⁵I lo que permite su detección y cuantificación precisa. En una muestra de PMCA, reconstituida en micelas mixtas de detergente (C₁₂E₁₀) y PC, la sonda se incorpora en las micelas, demostrando un comportamiento fisicoquímico indistinguible al de PC. Por irradiación mediante una lámpara UV a 366 nm se produce la fotólisis que desencadena la unión covalente de la sonda a su entorno inmediato. Se ha comprobado que una mayor marcación de la PMCA en estado de equilibrio, se relaciona con una mayor accesibilidad de los segmentos transmembrana a los lípidos de su entorno (66). A través de la cuantificación de la incorporación específica de [¹²⁵I]TID-PC/16 se ha observado una incorporación diferente del reactivo entre los diversos conformémeros de la bomba. De manera general, se ha observado que las condiciones que llevan a una conformación activada de la bomba, tales como la presencia de calmodulina y fosfolípidos ácidos, disminuye la incorporación específica de la sonda. Esto se interpreta como una menor exposición de los segmentos transmembrana a los lípidos del entorno. Por el contrario, para las conformaciones asociadas a la inhibición de la proteína la incorporación específica resulta mayor (66,67).

Con el objetivo de caracterizar el comportamiento activador del AS86 (**Figura 8.2**) y detectar la conformación de la PMCA a la que conduce, se llevaron a cabo experimentos de fotomarcación hidrofóbica utilizando la sonda [¹²⁵I]TID-PC/16 en diferentes condiciones experimentales. Con la misma herramienta, buscamos caracterizar el efecto producido por la unión covalente del AS86 en presencia y ausencia de CaM (**Figura 8.3**).

Los resultados obtenidos se describen en la **Figura 8.5**. Se determinó la incorporación específica de [125 I]TID-PC/16 a la PMCA, en distintas condiciones experimentales, en un medio de composición idéntica a la de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (**Figura 8.2 y 8.3**) pero en ausencia de ATP. En las condiciones que se detallan como “sin fotólisis” la concentración de AS86 utilizada fue de 5 μM , la cual produjo la máxima activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (**Figura 8.2 A**). En las condiciones detalladas como “con fotólisis” la concentración de AS86 fue de 15 μM , la cual produjo la máxima inhibición de la activación por CaM (**Figura 8.3**). Los detalles del proceso experimental se describen en *Metodologías (Sección 4.11)*.

En las condiciones “AS86 sin fotólisis” que se muestran en la **Figura 8.5**, los valores de incorporación específica de [125 I]TID-PC/16 que se alcanzaron en presencia de AS86 (tanto en presencia de Ca^{2+} como de Ca^{2+} -CaM) son similares a los obtenidos para Ca^{2+} -CaM y ácido oleico como se evidencian en la misma figura. Este resultado muestra que la accesibilidad a los lípidos del dominio transmembrana de la PMCA en presencia de AS86 es similar la causada por ácido oleico, CaM y ácido fosfatídico.

Respecto a las condiciones “AS86 con fotólisis” que se encuentran en la **Figura 8.5**, podemos observar que los valores de incorporación específica de [125 I]TID-PC/16 aumentan respecto de las condiciones “sin fotólisis” (tanto en presencia de Ca^{2+} como de Ca^{2+} -CaM). El valor de incorporación específica en presencia de AS86- Ca^{2+} -CaM aumenta con respecto al valor hallado en presencia de CaM (aproximadamente 80%) y se acerca a los niveles de incorporación específica hallados en presencia de Ca^{2+} sólo. Esto sugiere que la ausencia de activación por CaM producida por la unión covalente del AS86 (**Figura 8.3**) lleva a la PMCA a una conformación del dominio transmembrana autoinhibida (*Control*, 155%). Esto último concuerda con lo hallado en la **Figura 8.3** donde se observa que concentraciones crecientes del AS86 unido covalentemente a la PMCA no modifican la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

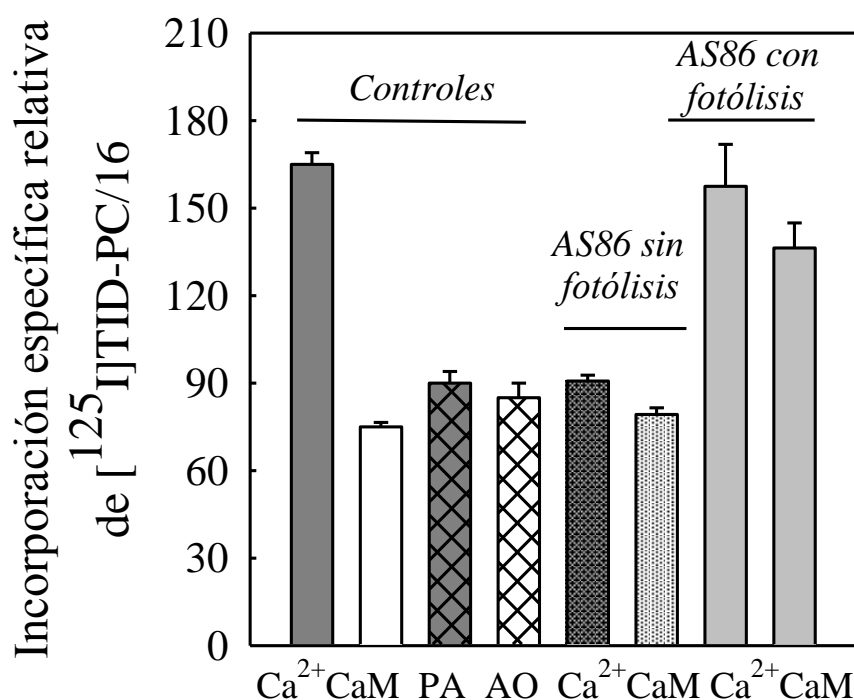


Figura 8.5: Efecto del AS86 sobre la incorporación específica de $[^{125}\text{I}]\text{TID-PC/16}$ a la PMCA. Incorporación específica relativa de $[^{125}\text{I}]\text{TID-PC/16}$ a la PMCA. La incorporación específica en presencia de EGTA (ausencia de Ca^{2+}) se toma como 100%. *Controles*, incorporación en presencia de condiciones saturantes de activadores de la bomba: 120 nM calmodulina, 60 μM ácido fosfatídico, 10 μM ácido oleico. La condición Ca^{2+} (70 μM libre) es la que corresponde a ausencia de activador. *AS86 sin fotólisis*, incorporación en presencia de 5 μM de AS86 con y sin CaM 120 nM. *AS86 con fotólisis*, incorporación en presencia de 15 μM de AS86 (post-fotólisis) con y sin CaM 120 nM. Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 3 experimentos independientes.

8.6. Reversión de la inhibición de la activación por CaM de la PMCA por C28W mediante la incubación con AS86

Como describimos previamente, el extremo C-terminal de la PMCA es el sitio regulatorio principal de la bomba, involucrado en la gran mayoría de los mecanismos de modulación y unión a diversas proteínas con las cuales forma complejos y la conectan a su vez con otras vías de señalización (100,142). Dentro de esta región se encuentra el sitio de unión a CaM, el CaM-BD según su denominación aceptada internacionalmente, el cual participa también en la interacción con los fosfolípidos ácidos (146) y además media el proceso de oligomerización de la bomba (170).

Los experimentos descritos en esta sección fueron realizados con el objeto de determinar si el dominio CaM-BD está involucrado en la interacción con los ácidos

grasos insaturados, utilizando la incubación y fotomarcación con AS86 del péptido C28. Este péptido corresponde a la secuencia mínima de la PMCAh4b necesaria para su interacción con CaM (244). Para tal fin, se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA reconstituida en micelas de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -DMPC ($X_{\text{DMPC}} = 0.25$) en presencia de CaM y C28, incubando previamente el péptido con AS86 y fotolisando a 254 nm. Los detalles del procedimiento y diseño experimental se describen en *Metodologías* (Sección 4.10.2).

En la **Figura 8.6 A** se observan los niveles de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de 120 nM de CaM en función de la concentración del péptido C28. En línea llena, se muestra una función hiperbólica decreciente que fue el mejor ajuste a los datos experimentales. El péptido C28 inhibe con una de $K_i = 0.16 \pm 0.05 \mu\text{M}$ la activación por CaM de la PMCA. A partir de este resultado, que coincide con lo previamente descrito (66), establecimos la concentración de péptido C28 y las condiciones a utilizar en el experimento de la **Figura 8.6 B**.

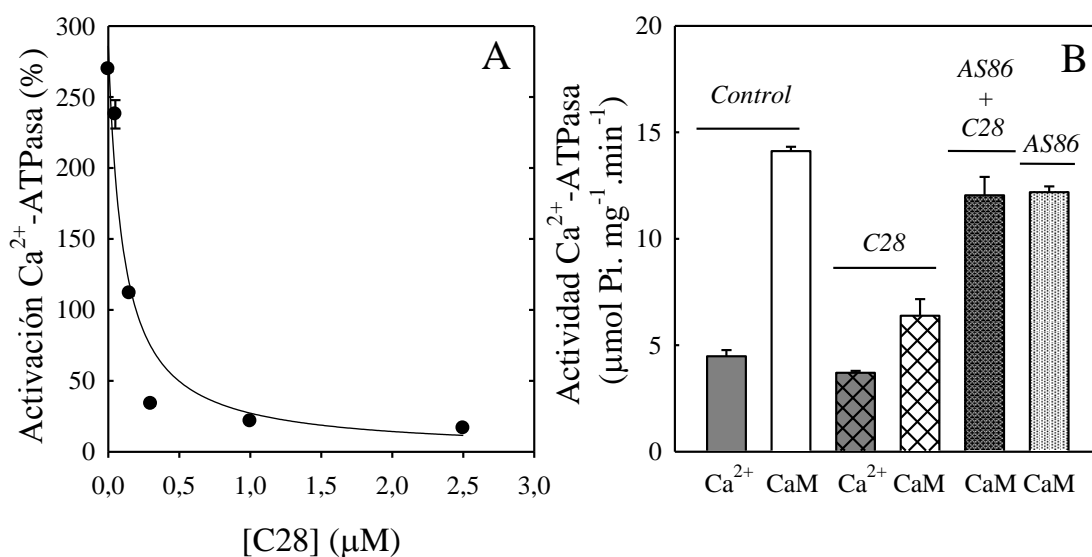


Figura 8.6: Efecto de la interacción covalente del AS86 con el péptido C28W sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA se determinó mediante el método de Fiske y Subbarrow en presencia de 2 mM ATP (*Metodologías*, sección 4.5 y 4.10). A, Activación Ca^{2+} -ATPasa relativa de la PMCA por CaM (%) en función de la concentración de C28W. El valor de actividad Ca^{2+} -ATPasa, en presencia de $5 \mu\text{M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ corresponde a 0% de activación. Todas las condiciones presentan 100 nM de CaM. B, actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con y sin CaM 120 nM (*Control*), en presencia o ausencia de $0.15 \mu\text{M}$ del péptido C28 (C28) y con previa fotomarcación del péptido con $15 \mu\text{M}$ de AS86 (C28 + AS86). Los resultados corresponden al promedio \pm DS de 2 experimentos independientes.

En la **Figura 8.6 B** se observan los niveles de actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA alcanzados en distintas condiciones experimentales. Como vemos, la incubación y la fotomarcación previa del péptido C28 con AS86 producen una reversión del efecto alcanzando niveles como los hallados en ausencia del péptido (*Control*, CaM). Este resultado sugiere una interacción directa del AS86 con dicho péptido ya que la unión covalente del reactivo al C28 impediría que éste interactúe con CaM y en consecuencia, ésta continúa activando a la PMCA.

8.7. Discusión

En el presente capítulo describimos algunas de las características fotoquímicas del AS86, complementando lo descrito en *Metodologías (Sección 4.9.3)* en cuanto a la síntesis y caracterización espectroscópica del mismo.

- Demostramos que el AS86 se comporta de manera análoga al ácido oleico con respecto a la modulación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA, cuando interactúa no covalentemente con la proteína.
- Presenta un comportamiento bifásico y el rango de concentraciones en las que este reactivo produjo la máxima activación es similar al hallado para el ácido oleico. Por otro lado, si bien los sistemas ensayados pueden ser ligeramente diferentes, dicho rango es semejante al descrito en bibliografía para ácido oleico, linoleico y araquidónico como principales exponentes de los ácidos grasos insaturados (48,156).
- En este mismo sentido, pudimos demostrar que el AS86 es capaz de interactuar directamente con la PMCA e inducir un cambio conformacional tal que los segmentos transmembrana se encuentran menos expuestos al entorno lipídico. Esta última característica es compartida por todos los activadores de la PMCA estudiados hasta el momento, incluido el ácido oleico. Esto último refuerza la similitud del reactivo como análogo del ácido oleico.

Con respecto a la interacción covalente del AS86 con la PMCA el comportamiento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa es sustancialmente diferente al hallado

cuando el reactivo actúa en forma no covalente. La inhibición de la activación por CaM, que se observó en función de la concentración de AS86 sugiere que la unión covalente del reactivo impide el cambio conformacional necesario para la activación de la bomba. Esta hipótesis, concuerda con los resultados de la **Figura 8.5**. La interacción covalente del AS86 produce un aumento en la exposición de los segmentos transmembrana a los lípidos del entorno, compatible con la conformación autoinhibida de la PMCA.

Por último, demostramos de manera indirecta que el péptido C28, correspondiente al dominio de unión a CaM, podría interactuar con el AS86 y esta unión covalente impedir el secuestro de CaM por el péptido, recuperándose así la activación de la PMCA por CaM. Este hallazgo contrastaría con lo propuesto por Rossi y col. (199) ya que descartan, mediante experimentos de proteólisis de la PMCA, que el sitio de unión a CaM fuese un posible sitio de interacción para los ácidos grasos insaturados.

Capítulo 9

Detección del(los) sitio(s) de interacción del ácido oleico en la PMCA mediante el uso del AS86 y la espectrometría de masa: *Resultados Preliminares*

9.1. Introducción

En el capítulo anterior pudimos demostrar el efecto ejercido por el AS86 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y la estructura de los segmentos transmembrana de la PMCA. Por otro lado, mostramos evidencias de la interacción del dominio de unión a CaM con el análogo de ácido oleico.

En este capítulo, presentamos una estrategia experimental que involucra la fotomarcación de la PMCA con AS86 y posterior análisis de los fragmentos por espectrometría de masa. El objetivo de dichos experimentos es hallar las posibles zonas de interacción entre el reactivo fotoactivable y la PMCA. Para ello se digirió la PMCA con V8 proteasa, se separaron los fragmentos por SDS-PAGE y luego se digirieron *in-gel* con tripsina para posteriormente analizar los péptidos por espectrometría de masa. Estos resultados constituyen la primera evidencia de un análisis mediante MALDI TOF TOF de fragmentos tripticos de la PMCA purificada de eritrocitos humanos.

9.2. Proteólisis controlada de la PMCA con V8 proteasa

Dado que la PMCA es una proteína de 134 kDa con una gran región hidrofóbica de 10 segmentos transmembrana, no es posible realizar el análisis de la proteína completa por espectrometría de masa con las estrategias empleadas para proteínas pequeñas. Es por esta razón que luego de la fotomarcación con AS86, realizamos una proteólisis controlada con proteasa V8, según lo descrito en "*Metodologías*" (Sección 4.12). Cuando se realiza en las condiciones establecidas, la proteasa V8 digiere a la PMCA únicamente en los residuos de ácido glutámico 322 y 661 generando tres fragmentos (**Figura 9.1**). Estos fragmentos coinciden con la ubicación de los tres dominios hidrofóbicos (DH) que se identifican en el dominio transmembrana de la

bomba: DH1 está formado por los segmentos transmembrana (TM) 1 y 2; DH2 por los TM3 y 4 y DH3 por los TM5 a 10 (62).

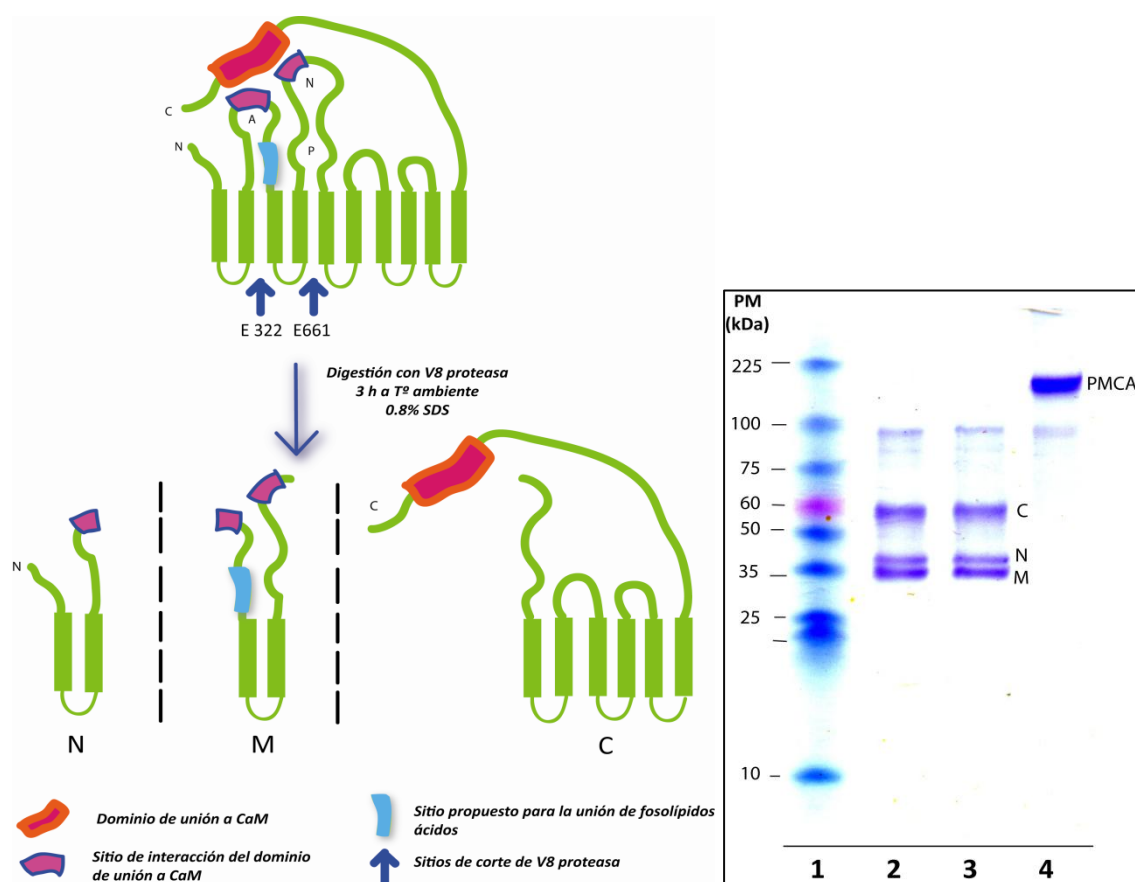


Figura 9.1: Proteólisis controlada de la PMCA con V8 proteasa. *Izquierda*, representación esquemática del patrón de proteólisis de la bomba de Ca^{2+} con proteasa V8 en condiciones controladas. Los fragmentos corresponden al extremo C-terminal, la región central y el extremo N-terminal de la proteína y se designan como C, M y N respectivamente. El esquema de la proteína sin digerir corresponde a la conformación autoinhibida. *Derecha*, SDS-PAGE de los fragmentos de la PMCA luego del tratamiento con proteasa V8 durante 3 horas. En el gel se incluyeron marcadores de peso molecular (1) cuyas masas moleculares se indican a la izquierda. En las calles 2 y 3 se indican a los fragmentos C-terminal (C), N-terminal (N) y Medio (M). La calle 1 corresponde a la proteína sin digerir. Las masas relativas de cada fragmento fueron 60 kDa (C), 38 kDa (N) y 35 kDa (M). Las condiciones de la electroforesis se describen en *Metodologías* (Sección 4.12). La imagen corresponde a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Los tres fragmentos son complementarios entre sí e integran la secuencia completa de la PMCA. En la **Figura 9.1** a la *Izquierda* podemos observar un esquema de la PMCA con los sitios de interacción de los principales moduladores y, además, los fragmentos obtenidos luego de la proteólisis con V8 proteasa. En dicha figura N, M y C, corresponden a los fragmentos N-terminal (conteniendo segmentos transmembrana 1 y 2), Medio (conteniendo segmentos transmembrana 3 y 4) y C-terminal (que contiene los segmentos transmembrana 5 a 10).

En la **Figura 9.1** a la derecha, observamos la imagen de un gel representativo de la proteólisis de la PMCA con su respectivo control sin digerir. Este patrón se obtiene luego de una digestión de 3 h a temperatura ambiente con V8 proteasa (*Metodologías, Sección 4.12*). En estas condiciones las cantidades generadas de los tres fragmentos son equivalentes. La identidad de cada uno de los tres fragmentos fue confirmada con el empleo de tres anticuerpos monoclonales (5F-10, JA3 y JA9) que reconocen distintos epitopes secuenciales de la PMCA (245).

9.3. Detección de fragmentos fotomarcados de la PMCA mediante MALDI TOF-TOF

Realizamos la fotomarcación de la PMCA reconstituida en micelas mixtas de C₁₂E₁₀/DMPC con AS86. El procedimiento fue realizado tal como se describe en *Metodologías (Sección 4.12)*. Utilizamos dos concentraciones de AS86: 5 y 15 μ M, basándonos en los experimentos de actividad Ca²⁺ATPasa representados en la **Figura 9.1 y 9.2**. En este sentido, no se obtuvieron diferencias entre los fragmentos que se hallaron como posiblemente modificados en cada condición. Es probable que la estrategia aplicada no tenga la sensibilidad suficiente para detectar las diferencias, dado que las concentraciones se encuentran en el mismo orden. Las condiciones de marcación fueron idénticas a las del experimento de actividad pero en ausencia de ATP. También se procesó una muestra de PMCA sin marcar (en ausencia de AS86) que también fue sometida a las mismas condiciones de fotólisis a 254 nm.

Luego de la fotomarcación se dializaron todas las muestras para posteriormente proteolizarlas con V8 proteasa. Las muestras se separaron por SDS-PAGE (gradiente 4-20%). Se obtuvieron patrones de digestión similares a los mostrados en la **Figura 9.1**. Las bandas de cada fragmento de la PMCA, visualizadas mediante una tinción suave con *Coomassie Blue-R*, se escindieron del gel y se digirieron con tripsina. Los péptidos trípticos resultantes se extrajeron del gel y se analizaron por MALDI TOF-TOF en modo positivo en el *Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Proteínas y Espectrometría de Masa (LANAIS-PROEM)*. Paralelamente, se procesó un fragmento del gel sin proteína como blanco y una banda correspondiente a BSA que se sembró en

el gel para utilizarlo como control interno de la técnica de digestión. Se realizaron triplicados independientes de cada análisis.

La cobertura inicial obtenida de toda la secuencia de la PMCA en estas condiciones fue de un 50%. Con el término *cobertura* nos referimos a los péptidos trípticos hallados experimentalmente en la muestra de PMCA sin marcar que se condicen con la digestión teórica realizada *in silico* (Ver *Metodologías*). En la **Figura 9.2** se resaltan las secuencias correspondientes a los péptidos trípticos de la PMCA identificados por espectrometría de masas, para dos muestras independientes de la PMCA sin marcar. Como vemos, muchas de las secuencias que no se pudieron hallar mediante esta estrategia corresponden a segmentos transmembrana. La imposibilidad de identificar dichas secuencias hidrofóbicas podría disminuir las posibilidades de hallar uno de los posibles sitios de *ataque* del análogo de ácido oleico. Sin embargo, dada la carga neta que presentaría el AS86 a pH= 7,4, es más probable que la interacción fuera en la zona de interfase.

Posteriormente se realizó un análisis exhaustivo de los espectros de masa obtenidos para cada fragmento proteolítico en las condiciones ensayadas: *Control* (PMCA irradiada sin AS86), *Muestra* (PMCA irradiada a 254 nm en presencia de AS86). Los espectros se analizaron manualmente comparando las distintas señales obtenidas en las muestras incubadas con AS86 y el control, teniendo en cuenta los valores de MH^+ obtenidos por la digestión tríptica *in silico* de la secuencia de la PMCA. Una vez halladas las señales con m/z diferenciales, éstas se evaluaron mediante un *software* (GPMW 5.10) a fines de definir posibles aductos entre AS86 y PMCA. Se configuró el *software* para que considere hasta 3 posibilidades de modificaciones (carbamilación en C, oxidación en M o W, unión de AS8, unión de AS86). De esta forma, cada m/z hallado tiene una serie de posibles combinaciones de aductos en función de la correspondencia entre su MH^+ experimental y el MH^+ teórico (calculado por el *software*) de los posibles candidatos. Se empleó esta estrategia de búsqueda ya que, si bien se encontraron varias señales diferenciales entre *muestra* y *control*, éstas fueron de baja intensidad e imposibles de fragmentar para identificar.



Figura 9.2: Cobertura de la secuencia de la PMCA *h4b* por MALDI TOF TOF. Secuencia de la PMCA *h4b*, separada en los 3 fragmentos proteolíticos. En rojo se encuentra marcada la cobertura hallada en 3 experimentos independientes en la muestra sin marcar. Las secuencias subrayadas corresponden a la ubicación putativa de los segmentos transmembrana. En verde se representan los dos sitios de corte de V8 proteasa.

En la **Tabla 9.1** se listan los detalles de las señales diferenciales que se hallaron en la muestra incubada con AS86 en al menos uno de los experimentos independientes y estuvieron ausentes en la muestra control. Para cada m/z encontrado el programa arroja varias posibilidades de marcación que concuerdan con la masa determinada y con los criterios introducidos. Como vemos, a pesar de que la cobertura general de secuencias no difirió significativamente en los 3 fragmentos analizados (M, N y C, Figura 9.2) la mayor parte de los fragmentos posibles asignados por el programa corresponden al fragmento C (donde se encuentra el C-terminal).

Tabla 9.1

Picos diferenciales hallados en la muestra de PMCA marcada con AS86 y ausentes en el control

Masa (Da)	Secuencia y modificación posible	Error (Da)	Ubicación en PMCAh4b
2103.98	PW/LPECTPIY/IQ + 4 AS8	0.04	395-402
2108.98	LK/AVQMLWVNLIMDTF/AS + 1 AS86 + 2 oxid	0.07	872-885
1589.76	KF/FDIDSGR/KA + 2 AS86	0.05	942-948
2692.29	AK/EASDIILTDDNFTSIVKAVMW/GR + 1 AS8 + 2 oxidaciones	0.02	812-832
1055.61	RR/GQILWF/RG + 1 AS8	0.05	1089-1094

Resulta interesante aclarar que las secuencias detalladas en la **Tabla 9.1** se encuentran en la cobertura de la **Figura 9.2**. La única excepción es la secuencia LK/AVQMLWVNLIMDTF/AS (Ubicación 872-885) que sólo se encontró una sola vez en la muestra control y por eso no se incluyó en la cobertura. Este hecho está relacionado con la naturaleza hidrofóbica de dicha secuencia (pertenería a una sección del dominio transmembrana de la PMCA, tal como está detallado en la **Figura 9.2**) que dificulta su ionización. Por otro lado, observamos que en la muestra marcada con AS86 también se encontraban los picos correspondientes a las secuencias sin marcar, esto era esperable dado que la eficiencia de marcación siempre es menor al 100% para este tipo de reactivos (50,71). Es importante aclarar que dado que no existe una separación previa de los fragmentos no modificados con el AS86, las posibles señales correspondientes a los péptidos fotomarcados no fueron las de mejor relación señal-ruido en el espectro. Este hecho imposibilitó la fragmentación MS/MS de dichas señales, lo que no permitió la identificación definitiva de las secuencias aminoacídicas. Ante la imposibilidad de identificar, tomamos algunos criterios de selección para proponer las secuencias más probables. Por un lado, se tomó como criterio más fuerte que la señal diferencial apareciera como mínimo en 2 de los 3 experimentos independientes que se realizaron. Así, nos quedamos solamente con una secuencia posible, que se detalla en la **Tabla 9.2**. Además, como vemos en la **Tabla 9.1**, el error con el que se propone dicha combinación es el de menor magnitud dentro de los hallados, hecho que otorga significación a la evidencia.

Como mencionamos, en la **Tabla 9.2** se detalla la señal de m/z $2692,29 \pm 0.02$ Da, hallada en la muestra correspondiente al fragmento de 60 kDa marcado con AS86. Como vemos, la masa de dicho fragmento coincide con la correspondiente a la secuencia **E₈₁₂ASDIILTDDNFTSIVKAVMW₈₃₂** con dos oxidaciones y una molécula de AS8 unida. Dado el exhaustivo y extenso tratamiento al que se someten las muestras luego de la fotomarcación, es posible que exista una hidrólisis del enlace éster del AS86 quedando moléculas de AS8 unidas covalentemente a los péptidos. En la muestra sin marcar, hallamos un fragmento con una masa de $2399,5 \pm 0.02$ Da que correspondería al mismo péptido pero sin la incorporación del reactivo.

Tabla 9.2

Zona propuesta para la interacción de la PMCA con AS86. Señal hallada en 2 de los 3 muestras fotomarcadas.

Secuencia propuesta	PMCA sin marcar (m/z [M+H] ⁺)	PMCA con AS86 (m/z [M+H+AS8] ⁺)
AK/E₈₁₂ASDIILTDDNFTSIVKAVMW₈₃₂ /GR + 2 oxidaciones	2399.05	2692.29

En la **Figura 9.3** vemos donde se encontraría el fragmento propuesto como uno de los sitios de unión en un esquema de la PMCA (detallado en *rojo*). La **Figura 9.3** corresponde a un modelo de la PMCA basado en la estructura tridimensional de la SERCA (código PDB *3b9b*). Como vemos, la secuencia se encontraría en una zona cercana a la interfase membrana-citosol y a una de las zonas propuestas para la unión de los fosfolípidos ácidos (123,149), dicha secuencia se encuentra ausente en la SERCA.

9.4. Discusión

La estrategia aquí presentada describe una primera aproximación al uso de la espectrometría de masa para la detección de aductos covalentes formados luego de una fotomarcación de afinidad de la PMCA.

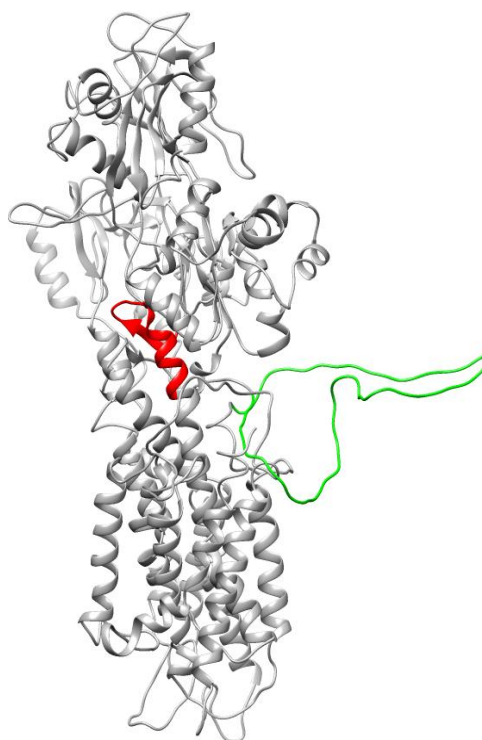


Figura 9.3: Modelo por homología de la PMCA realizado sobre la estructura de la SERCA (código PDB 3b9b). La estructura de la PMCA, que comprende los aminoácidos 1-1056, se obtuvo por un modelo de homología tomando la estructura de la SERCA como modelo (Protein Data Bank code 1T5S) y el alineamiento publicado previamente por Penniston y col. (246), para más detalles ver *Metodologías*. En rojo se indica la zona propuesta para la interacción por AG insaturados (E812-W832), en verde se indica la zona propuesta para la interacción con fosfolípidos ácidos.

Como sabemos, se ha utilizado ampliamente la fotomarcación para hallar el sitio de unión para distintos ligandos (48,72,247). Típicamente, la presencia de una marca radiactiva en el ligando fotoactivable permite detectar la zona de la proteína donde existe interacción (48). Las ventajas de la estrategia propuesta en esta tesis radican en su versatilidad, ya que es factible de realizarse con cualquier otro ligando fotoactivable y en la ausencia de marca radiactiva para la detección de los aductos. Por otro lado, la cantidad de proteína modificada con el reactivo es aún una limitación para la aplicación de la técnica. Como vimos, fue imposible fragmentar las señales atribuibles a péptidos unidos con el reactivo dada su baja relación señal-ruido.

Por otra parte, la cobertura de la secuencia de la PMCA alcanzó el 50 %, siendo este valor bastante elevado para una proteína de membrana tan compleja (248). La principal dificultad que presenta este tipo de proteínas para su análisis por EM es la ausencia de residuos cargados en los dominios transmembrana. Los péptidos enriquecidos en estos residuos presentan dificultades para ionizarse y por lo tanto,

llegar al detector (248,249) tanto mediante MALDI o bien utilizando ESI (electrospray) como método de ionización. Además, la necesidad reconstituir a la proteína en micelas de detergente nos obliga a aplicar una estrategia previa de separación de dichas moléculas ya que interfieren con la ionización de los péptidos tripticos. Los esfuerzos en experimentos posteriores estarán destinados, en parte, a aumentar la recuperación de secuencias correspondientes a dominios transmembrana de la PMCA mediante, por ejemplo, una estrategia de desnaturalización con urea, luego de la marcación con AS86, para promover además la adecuada digestión triptica de dichos fragmentos.

Como detallamos en la **Tabla 9.1**, hallamos varias señales diferenciales en la muestra marcada con respecto al control. Sin embargo, como dijimos, la identificación precisa del sitio no fue posible dada la imposibilidad de hacer MS/MS al fragmentar dichas señales diferenciales. Además, a excepción del fragmento propuesto, el resto de las señales sólo se encontraron en 1 de los 3 experimentos que se realizaron. La baja eficiencia de marcación y la posibilidad de que la unión de una o más moléculas de reactivo provoque una menor ionización de los péptidos podrían ser causas para la baja abundancia de dichas señales. Es necesario destacar la falta de nuevos experimentos, con esta u otra estrategia, que permitan confirmar o descartar estas zonas. Con respecto a la zona aquí propuesta para la interacción del AS86 con la PMCA (**E₈₁₂ASDIILTDDNFTSIVKAVMW₈₃₂**), diremos que podría ser parte de una zona de mayor tamaño donde interactúen varias moléculas de ácidos grasos para ejercer su efecto modulador. Como vemos en la **Figura 9.3**, según el modelo de la PMCA, dicha zona se encontraría cercana a la interfase citosol-membrana donde sería más probable hallar este tipo de moléculas interactuando con la proteína. Como mencionamos, aunque no fue posible fragmentar dicha señal, la misma apareció en 2 de los 3 experimentos independientes realizados, sugiriendo fuertemente la participación de dicha zona en la modulación.

Ante la necesidad de realizar más experimentos para confirmar o descartar las zonas aquí propuestas (o encontrar nuevas), propusimos analizar los péptidos mediante una estrategia experimental distinta. Hemos realizado un análisis de la PMCA marcada con AS86 mediante un espectrómetro LC(nano-HPLC)-MS-MS Q exactive (Orbitrap). La separación mediante el sistema de nano HPLC tiene la ventaja de superar el fenómeno de "apantallamiento" de las señales abundantes sobre las

poco abundantes (modificadas) que llegan al detector, mejorando así la relación señal-ruido de dichas señales y permite la fragmentación MS/MS. Al momento, realizamos sólo un experimento que incluyó la desnaturalización de la PMCA con urea, reducción, carbamidometilación, digestión trípica y análisis de los fragmentos (marcados y control) mediante un espectrómetro de masas que cuenta con una celda de HCD (High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap (marca Thermo Scientific, modelo Q-Exactive). La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por nano cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. En principio, los resultados obtenidos son prometedores ya que se obtuvo un 70% de cobertura de la h4bPMCA y apenas un 10% aproximadamente de la secuencia correspondiente a la h1bPMCA. Se obtuvieron diferencias entre los péptidos hallados entre la muestra marcada y el control. Brevemente, se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. La duración del ciclo depende de la resolución utilizada. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MS MS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma. Con este diseño, pudimos ver que muchos de los péptidos diferenciales entre muestra y control no han sido fragmentados dada su inadecuada relación señal-ruido. Actualmente, el laboratorio continúa trabajando en nuevos experimentos que permitan un mejor análisis de los fragmentos marcados.

PARTE IV

DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 10

Discusión general

10.1 Modulación de la PMCA por fosfolípidos neutros

En la presente tesis nos hemos abocado al estudio de la dependencia de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA con la fracción molar de fosfolípidos neutros y, a su vez, ensayamos la dependencia con el largo y tipo de cadena carbonada del fosfolípido. La función biológica de las proteínas integrales de membrana es sensible al tipo de lípidos presente en las preparaciones utilizadas para su estudio. De aquí se desprende la necesidad de estudios integrales de sistemas de reconstitución anfifílicos que permitan indagar el comportamiento y estructura de las proteínas de membrana.

10.1.1. Fase inhibitoria de la actividad Ca^{2+} -ATPasa

En el Capítulo 5, hemos observado un comportamiento bifásico caracterizado por una fase inicial de aumento de la actividad en función del aumento de X_{PC} y luego una disminución de la misma (hasta aproximadamente un 40% de la máxima) a partir de $X_{\text{PC}} = 0.30-0.40$ (**Figura 5.1**). Este comportamiento fue similar para la mayoría de los sistemas ensayados (con excepción de DLPC, donde la caída de la actividad se observó en $X_{\text{PC}} = 0.7$). Se ha demostrado previamente que el detergente $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ forma micelas esféricas en soluciones acuosas (235) y cuando se mezclan fosfolípidos de cadena larga con dichas micelas, ambos componentes se mezclan para formar micelas con un tamaño similar (**Figura 6.1 y 6.2**). Sin embargo, cuando estas micelas mixtas se enriquecen progresivamente en lípidos, parece ocurrir una transición hacia la formación de vesículas lo cual aumenta la posibilidad de formación de agregados (**Figura 6.1 y 6.2**). Además ha sido descrita la existencia de una población de estructuras denominadas bicelas (250) que se caracterizan por presentar una porción central donde se forma una bicapa lipídica rodeada por "bordes" de moléculas de detergente (251). El cambio en la organización estructural de los lípidos y las moléculas de detergente está necesariamente acompañado por cambios en la curvatura y aumento en la presión lateral en el centro de las bicapas (22). Estos cambios podrían

explicar parcialmente la disminución de actividad de la PMCA ya que pueden ejercer un efecto directo sobre la conformación de la proteína, tal como ha sido descrito para otros miembros de la familia de las P-ATPasas en sistemas de características similares (252-254). Cuando las micelas mixtas están formadas por detergente y DLPC, la actividad Ca^{2+} -ATPasa decae, a una X_{PC} mayor. Este efecto podría estar relacionado con que una mayor cantidad de moléculas de este fosfolípido son necesarias para modificar el tamaño y/o la forma de las partículas presentes en la mezcla de $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ /DLPC (**Figura 6.2**). Este fenómeno podría ser explicado por un mayor grado de mezclado y homogeneización entre un lípido como DLPC y las especies formadoras de micelas que entre éstas y DMPC. Dicho de otra forma, como DLPC es un fosfolípido pequeño, su geometría podría permitir "acomodar" una mayor cantidad de moléculas en la micela esférica.

Ha sido demostrado que luego de la transición micela-vesícula, puede haber una co-existencia de bicelas con vesículas (223,255). En nuestro sistema, luego de la transición, la PMCA podría estar inserta en una vesícula con su sitio catalítico del lado luminal de la vesícula o expuesta a la solución. Sin embargo, en este trabajo demostramos que el descenso de la actividad Ca^{2+} -ATPasa observada a X_{PC} mayores no es el producto de un llenado de la vesícula con el ión calcio o a una falta de accesibilidad a sustratos y/o cofactores. Si bien este resultado no descarta la posibilidad de un cambio en la afinidad de la PMCA por el Ca^{2+} en situaciones donde aumenta la X_{PC} , nuestros resultados indican que no se ve modificada la $k_{0.5}$ para Ca^{2+} ante un cambio en el sistema de reconstitución. En este sentido, vimos que la inhibición de la PMCA ante X_{PC} elevadas fue similar tanto en presencia de 30 μM o 2 mM de ATP (**Figura 7.1 y 5.1**, respectivamente) sugiriendo que la afinidad de la PMCA por el ATP no se modifica por un aumento en la X_{PC} .

Kosk-Kosicka y col. (256) han demostrado que el agregado de fosfolípidos neutros a una preparación deslipidizada de PMCA no produce cambios en los niveles de *EP* en estado estacionario. Por el contrario, en esta tesis demostramos que la reconstitución de la PMCA en sistemas con X_{PC} elevadas aumenta los niveles de *EP* junto con un descenso en el *turnover* de la PMCA (**Figura 7.1 y tabla 6.1**). Cuando una enzima presenta un ciclo de reacción cerrado, como es el caso de las P-ATPasas, la suma de los tiempos de residencia de la enzima en cada intermediario será igual a la

suma del tiempo de permanencia de la enzima en cada ciclo (241). Considerando esto, si el tiempo que le toma a la PMCA realizar un ciclo completo aumenta de aproximadamente 17, 1 ms en $X_{\text{DMPC}} = 0.25$ a 29.3 ms en $X_{\text{DMPC}} = 0.7$, el tiempo de residencia en uno o más intermediarios debe estar variando en aproximadamente 12.4 ms. En concordancia, nuestros resultados muestran que el tiempo de residencia en EP ($t(\text{EP})$) aumenta aproximadamente 7.4 ± 1 ms (de 4.5 ± 0.2 a 11.9 ± 0.8 , **Tabla 7.1**) cuando X_{DMPC} cambia de 0.25 a 0.7. Estos resultados sugieren fuertemente que la disminución del *turnover* observado a X_{PC} elevadas está relacionado con un aumento del $t(\text{EP})$. Como describimos en la sección Resultados, la única posibilidad de que aumente el nivel de EP en estado estacionario (y consecuentemente el $t(\text{EP})$) y disminuya de manera concomitante el *turnover* de la enzima es que disminuya la velocidad de desfosforilación. Por lo tanto, sugerimos que un aumento en la X_{PC} de medio de reconstitución de la PMCA produce un menor *turnover* de la enzima a través de una disminución en la velocidad de desfosforilación.

Por otro lado, ha sido descrito que el ATP además de ser un sustrato en la fosforilación del intermediario $E_1\text{Ca}$ funciona como modulador aumentando las velocidades de los pasos del ciclo involucrados en el *turnover* de la fosfoenzima ($E_1\text{CaP} \rightarrow E_2\text{P}$ y $E_2\text{P} \rightarrow E_2$) como también la transición $E_2 \rightarrow E_1\text{Ca}$ (257). Teniendo en cuenta que la afinidad aparente de la PMCA por el ATP es 25 μM en su sitio catalítico y 250 μM en su sitio modulador (234), los resultados de la **Figura 7.1** sugieren que el aumento del $t(\text{EP})$ no podrían deberse a la ausencia del efecto modulador del ATP.

10.1.2. Fase de activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa

La actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA es máxima en presencia de micelas mixtas compuestas por DMPC (de un grosor hidrofóbico aproximado de 24 Å, (195)). El efecto activador de diferentes fosfolípidos neutros fue previamente investigado en otras P-ATPasas. La SERCA presenta actividad máxima cuando está incluida en bicapas con un grosor hidrofóbico de alrededor de 30 Å (258). La dependencia de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa con el largo de cadena carbonada del fosfolípido es ligeramente diferente a la de la SERCA ya que presenta un largo óptimo de cadena hidrofóbica de 22 carbonos en ausencia de colesterol y de 18 carbonos en presencia

del mismo (259). En concordancia con nuestros resultados en la PMCA, la reconstitución de la SERCA (242) y la Na^+/K^+ -ATPasa (259) en bicapas donde el grosor hidrofóbico difiere del óptimo provoca un descenso en el *turnover* de las enzimas. En la SERCA este efecto fue atribuido a un aumento en los niveles de EP en estado estacionario producido por una menor velocidad de desfosforilación (242). Por el contrario, nuestros resultados muestran que la reconstitución en micelas mixtas de DOPC produce una disminución en los niveles de EP con respecto a DMPC pero no provoca cambios en el tiempo de residencia en EP. Un comportamiento similar se obtuvo para X_{PC} mayores sugiriendo que el aumento en el $t(\text{EP})$ está relacionado con las características físicas de las micelas o bicelas y no en cambios en el grosor hidrofóbico. En concordancia con estos hallazgos, Sonntag y col. (195) sugirieron que un cambio en el grosor hidrofóbico de las bicapas que contienen a la SERCA tendría un efecto directo en el cambio conformacional que se da entre los estados E_1 y E_2 .

En nuestro laboratorio, hemos utilizado un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina ($[^{125}\text{I}]\text{TID-PC}/16$) para estudiar las distintas conformaciones del dominio transmembrana de la SERCA (66), la Na^+/K^+ -ATPasa (67) y diferentes isoformas de la PMCA (260). Hemos visto que el dominio transmembrana de estas ATPasas cambia durante el ciclo catalítico, y también varía el número de lípidos anulares -es decir, los cambios conformacionales que permiten el transporte de iones por estas P-ATPasas involucran cambios en el arreglo de los lípidos que rodean a la proteína-. Con respecto a los estados E_2 y $E_1\text{Ca}$, determinamos que el número de moléculas de DMPC asociadas directamente con el dominio transmembrana de la PMCA era de 19 y 30, respectivamente (260). En este sentido, Dodes Traian y col. (219) desarrollaron un modelo matemático combinando información cinética y estructural de la enzima en donde ésta selecciona un microambiente lipídico particular y luego estos lípidos provocan un pequeño cambio conformacional en el dominio transmembrana que posteriormente es propagado hacia el dominio catalítico. En este modelo (**Ecuación 5.3**) el parámetro $X_{0.5}$ está relacionado con el grado de cobertura de la superficie transmembrana por parte de los lípidos, generando la mitad de la activación máxima. En este sentido, pudimos estimar la cantidad de moléculas de PC que promueven la máxima activación de la PMCA. Si consideramos que el número de agregación del $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ no cambia (al menos hasta $X_{\text{DMPC}} = 0.25$), podríamos proponer que la máxima

activación de la PMCA se observa cuando existen 25 moléculas de DMPC en la micela mixta (Ver *Introducción, Sección 1.2.2.3*). Es importante notar que esta consideración sólo sería válida si el tamaño de partícula no es variable (como podemos ver en las **Figuras 6.1 y 6.2** para el rango de X_{PC} mencionado). Además este valor resultó ser similar para la mayoría de los fosfolípidos neutros ensayados (excepto para DLPC). Es importante destacar que este número de fosfolípidos es similar al número de moléculas de fosfatidilcolina directamente asociadas al dominio transmembrana de la PMCA (260). Sin embargo, este hecho no indica necesariamente que éstas 25 moléculas de DMPC estén directamente asociadas con la proteína.

Las simulaciones de dinámica molecular presentadas en el Capítulo 7, revelaron que las capas superiores de las bicapas de DMPC y DOPC se adaptan para interactuar con las cargas positivas de los residuos de Lys que quedarían localizados cerca de la interfase en el modelo (**Figura 7.2**). Sin embargo, la capa inferior de la bicapa de DOPC deja varios residuos cargados positivamente dentro del dominio (*core*) hidrofóbico, mientras que en presencia de una bicapa de DMPC, estos residuos quedan ubicados en un ambiente más polar, interactuando con las cabezas polares (grupos fosfato) o expuestos al solvente.

Las simulaciones fueron llevadas a cabo en ausencia de moléculas de detergente, a diferencia de los sistemas de reconstitución utilizados en el resto de los experimentos de la presente tesis. Si bien la presencia de moléculas de detergente aumentaría la fluidez de la bicapa, ha sido demostrado recientemente que el grosor de una bicapa compuesta por $C_{12}E_8$ y DOPC (en una relación 30:80, es decir una X_{PC} de 0.30 aproximadamente) permanece casi constante con respecto a una bicapa compuesta por fosfolípidos puros (195). Debido a ello, la estructura proteica casi no se ve afectada por la presencia de detergente, conservando su integridad funcional. En este sentido, Dodes Traian y col. (219) demostraron mediante el uso de ANS (ácido naftalen sulfónico) y monitoreo de la fluorescencia de Trp que los cambios conformacionales producidos ante la activación por fosfolípidos neutros son sutiles y no implican reorganizaciones estructurales grandes tales como un desplegamiento parcial/total en presencia de detergente. Si consideramos a estos resultados como extrapolables a otras proteínas de membrana, sería válida la hipótesis adoptada en muchos estudios experimentales e *in-silico* en proteínas de membrana: las estructuras

cristalinas resueltas en detergentes aportan información sobre conformaciones nativas o cuasi-nativas. Teniendo en cuenta esta evidencia, proponemos que la menor actividad Ca^{2+} -ATPasa encontrada en $X_{\text{DOPC}} = 0.3$ podría ser una consecuencia directa del aparente desajuste o *mismatch* hidrofóbico originado por una bicapa más gruesa (**Figura 7.2**). Este efecto se observó también a X_{PC} mayores, donde la actividad Ca^{2+} -ATPasa es menor en DOPC con respecto a DMPC (**Figura 5.1**). En general, en presencia de X_{DOPC} mayores, la disminución en el número de recambio no sería sólo a causa de un aumento en el $t(\text{EP})$ (**Tabla 7.1**) sino también a causa del *mismatch* hidrofóbico que se produce entre estas bicapas y la proteína (**Figura 7.1**).

Una diferencia remarcable entre la SERCA y la PMCA es que la última es activada por calmodulina y por fosfolípidos ácidos (129,261). La activación de la PMCA por estos moduladores incluye cambios conformacionales que, entre otros aspectos, modifican el área accesibles a los lípidos del dominio transmembrana (68). La región que se ha propuesto para la unión de los fosfolípidos ácidos es una secuencia básica enriquecida en residuos de Lys localizada cerca de la interfase (lípidos/agua) del primer bucle citosólico (123). De este modo, si consideramos la gran densidad de residuos de Lys en la región de unión de fosfolípidos ácidos cercana a la interfase, es posible que la PMCA presente un grosor hidrofóbico óptimo más estrecho que la SERCA y la Na^+K^+ -ATPasa. En otras palabras, esta región presenta aspectos estructurales que podrían favorecer la existencia de un grosor hidrofóbico menor para la PMCA. Si consideramos que la estructura secundaria de las hélices permanece casi inalterada, es claro que las hélices transmembrana deberían adoptar varios ángulos de inclinación en función del *mismatch* que se provoque (262), generando así una interacción lípido proteína más íntima. En este sentido, Mitra y col. (263) demostraron que aunque el grosor hidrofóbico promedio de las membranas biológicas sea aproximadamente 30 Å, ocurren variaciones de 5 Å o más cuando la proteína se inserta en las membranas. Por lo tanto, es posible que, en condiciones fisiológicas, la PMCA produzca una disminución del grosor de la membrana que la rodea para llegar a su actividad óptima.

Este trabajo constituye uno de los primeros estudios que relaciona el sistema de reconstitución de la PMCA desde un enfoque biofísico con su actividad catalítica, contribuyendo a encontrar la relación que existe entre la estructura del dominio hidrofóbico de la bomba y su función.

10.2 Modulación de la PMCA por ácidos grasos insaturados

La modulación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de las PMCA por AGI ha sido menos estudiada que el efecto de los fosfolípidos ácidos. Probablemente esto se deba a que los AGI ejercen un efecto de menor magnitud activadora que los fosfolípidos ácidos. La presencia de AGI libres en la membrana en el entorno inmediato de la proteína, sería factible en diversos momentos de la célula ante el transcurso de una cascada de señalización, ya que se ha demostrado ampliamente su potencial como segundos mensajeros. En la presente tesis hemos complementado el estudio de la relación de la PMCA con las entidades lipídicas que la rodean mediante el uso de un análogo fotoactivable de ácido oleico (AS86).

10.2.1. El uso del AS86 como herramienta para el estudio de la modulación por ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados libres (AGIL) son nutrientes generadores de energía que actúan como moléculas de señalización en varios procesos celulares. Se ha demostrado que estas moléculas y sus metabolitos juegan un papel central en la homeostasis del Ca^{2+} en las células (264-267). En cambio, los ácidos grasos saturados participan de fenómenos relacionados con la modificación post-traducciona de diversas proteínas, siendo la S-palmitoilación y la N-miristoilación los más comunes (268,269). Con respecto al efecto de estos moduladores sobre las P-ATPasas, se ha demostrado que a altas concentraciones de ATP los AGI (incluido el ácido oleico) inhiben a la Na^+K^+ -ATPasa, disminuyendo la afinidad por K^+ y la actividad máxima (270). Además, se ha descrito que la H^+K^+ -ATPasa también es inhibida por AGI libres de cadena larga que disminuyen su capacidad de fosforilación (271,272). En particular, el papel del ácido oleico (AO) sobre estos procesos ha sido menos estudiado y se han descrito efectos contrarios del mismo incluso para un fenómeno similar (Ver *Introducción, Sección 2.2.4.4*). Con respecto a la PMCA, se ha descrito tanto la modulación positiva de la actividad como la inhibición por parte del ácido oleico y otros AGIL. De la bibliografía relevada, se desprende la necesidad de ahondar en los mecanismos moleculares que subyacen a la modulación observada por los ácidos grasos insaturados.

La estrategia aquí desarrollada para estudiar los detalles moleculares de la interacción de la PMCA con el ácido oleico se basó en la utilización de un análogo fotoactivable de ácido oleico (AS86) diseñado años atrás en nuestro laboratorio (199). Como describimos, fue necesario llevar a cabo optimización del proceso de síntesis y caracterización del compuesto obtenido, para la utilización como herramienta para hallar el(los) sitio(s) de interacción. Demostramos que la sonda sintetizada tiene un efecto similar al ácido oleico sobre la PMCA cuando interactúa de manera no covalente y, por lo tanto reversible, con la misma. Es interesante destacar que las concentraciones de máxima activación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa van de 4 a 6 μM tanto para AS86 como para el AO. El valor de estos experimentos radica en la demostración del efecto del análogo sobre la actividad de la enzima en las condiciones de trabajo actuales y servir de base para el diseño de las condiciones en los experimentos de espectrometría de masas. Además, utilizamos una herramienta previamente validada como es el $[\text{}^{125}\text{I}]\text{TID-PC}/16$ para demostrar que cuando el AS86 interacciona con la PMCA de manera no covalente se obtuvo una conformación más compacta del dominio transmembrana, similar a lo que sucede con AO y otros activadores (**Figura 8.5**). Este resultado aporta evidencias que convalidan el uso del AS86 como análogo del ácido oleico pero no nos brinda información sobre los posibles sitios de interacción del mismo. En este sentido, en la **Figura 8.3** se observó que la actividad Ca^{2+} -ATPasa no fue afectada por la unión covalente del reactivo en las concentraciones ensayadas, si bien a concentraciones mayores existe una inhibición de la misma (datos no mostrados). Sin embargo, pudimos observar que la unión del reactivo provocó la inhibición de la activación de la PMCA por CaM hasta alcanzar valores de actividad similares a los obtenidos en ausencia de CaM. Debemos agregar que para descartar que el efecto observado ocurriera por una interacción covalente del reactivo con CaM se realizó el experimento de dos maneras: con CaM presente al momento de la fotólisis o con CaM agregada con posterioridad al momento de medición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Los resultados de estas curvas no fueron significativamente diferentes. Esta comprobación permitió proponer que la inhibición de la activación por CaM se podría deber a la ocupación de sitios en la PMCA que estén íntimamente relacionados con la activación por CaM pero que no afectan la actividad Ca^{2+} -ATPasa *per se* en las concentraciones ensayadas. Al analizar esta situación en

donde el AS86 se encuentra unido covalente a la PMCA desde una óptica estructural, al menos desde la conformación del dominio transmembrana de la proteína, pudimos observar que en presencia de CaM y AS86 se obtuvo una mayor exposición del dominio transmembrana a los lípidos del entorno (**Figura 8.5**) compatible con lo observado en las conformaciones autoinhibidas de la PMCA. En el experimento detallado en la **Figura 8.6** evidenciamos indirectamente la interacción del péptido C28, secuencia de dominio mínimo de unión a CaM en la PMCA, con el AS86. Este experimento junto con lo observado en la **Figura 8.3** nos llevarían a proponer el dominio de unión a CaM como uno de los posibles sitios de acción para el ácido oleico. De esta hipótesis se desprende necesariamente una propuesta experimental que consista en una curva de actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA en las mismas condiciones que la realizada en la **Figura 8.3** pero en presencia de C28, donde se podría estimar una cierta afinidad aparente del péptido por el reactivo.

En términos del mecanismo de acción por el cual el AO, modularía a la PMCA, es posible que exista más de un sitio de interacción, tal y como proponen varios autores para los fosfolípidos ácidos (123,149,261). Con respecto a otros moduladores de las mismas características, por ejemplo el ácido araquidónico y el linoleico, algunos autores no descartan la posibilidad de una modificación de las características del entorno de membrana inmediato de la PMCA cuando se liberan estos moduladores en la célula, más que de la unión directa con sitios proteicos. Esto generaría una activación enzimática promoviendo la salida de Ca^{2+} hacia el medio extracelular (156). Por otro lado, Hwang y col. (158) estudiaron la supresión de la actividad inflamatoria de neutrófilos por AGI de 18 carbonos y demuestran que la activación de la PMCA por AO que promueve la salida de Ca^{2+} intracelular se condice con la disminución de la generación de anión superóxido y liberación de elastasa. En este trabajo en particular, se propone una interacción directa con la PMCA tanto del AO como del ácido linoleico.

10.2.2. Avances en el uso de la espectrometría de masa para la detección de los sitios de unión de ácidos grasos insaturados

La caracterización previamente descrita del AS86 permitió el diseño de los experimentos que involucraron la estrategia de detección de los aductos de

fotomarcación por espectrometría de masas. La estrategia de fotomarcación y posterior detección por espectrometría de masas de los fragmentos modificados ha sido utilizada para detectar interacciones lípido proteína específicas (75,248,249). Una de las ventajas de esta estrategia radica en el abandono de la marcación de las sondas con isótopos radiactivos y en la posibilidad de determinar los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción lípido-proteína. Sin embargo, los desafíos que se suelen presentar al utilizar esta estrategia se multiplicaron al intentar estudiar una proteína con las características de la PMCA: 10 dominios hidrofóbicos, de baja abundancia natural, baja estabilidad y un tamaño de 134 kDa.

En esta tesis, mediante una estrategia de proteólisis controlada y el empleo de espectrometría de masas MALDI-TOF hemos obtenido un 50% de cobertura de la secuencia completa de la *h4b*PMCA en los 3 experimentos realizados. Es importante aclarar que, dado que en nuestro laboratorio purificamos a dicha proteína desde glóbulos rojos humanos, lo que se obtiene es una muestra compuesta por aproximadamente un 80% de PMCA4 (*h4b*PMCA) y un 20% de PMCA1 (*h1b*PMCA) (121,142). Dada la baja abundancia de esta última isoforma se ha identificado sólo una cantidad poco significativa de péptidos, por esta razón los análisis se basaron en las secuencias halladas de la *h4b*PMCA. La modesta cobertura de las proteínas de membrana que se logra mediante EM cuando se utilizan las estrategias habituales empleadas para el análisis de proteínas por MALDI se puede deber a varios factores, siendo la gran cantidad de péptidos hidrofóbicos en los dominios transmembrana uno de los principales. En experimentos donde se desea identificar a una proteína mediante EM, una cobertura del 50% sería más que suficiente para cumplir con el objetivo. Sin embargo, dado que en el presente trabajo nos proponemos detectar péptidos modificados que nos brinden información sobre los sitios de unión de los AG insaturados, necesitamos cubrir gran parte de la secuencia aminoacídica y la baja cobertura nos podría hacer perder información valiosa. Una de las posibilidades existentes para mejorar la cobertura sería aumentar la concentración de las muestras de PMCA o bien ensayar la utilización de otras matrices de MALDI como el ácido 2,4-dihidroxibenzoico y nor-harmano (en los experimentos actuales sólo se ha ensayado con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) que han sido utilizadas para varios compuestos hidrofóbicos (273) y podrían recuperar la cobertura de los segmentos transmembrana.

Con respecto a la secuencia propuesta para la interacción con AGI, diremos que si bien dicha secuencia cumple con la mayoría de los criterios que detallamos anteriormente se necesitan experimentos donde podamos identificar al péptido mediante MS/MS. Para mejorar la abundancia de los péptidos marcados con AS86 y así poder fragmentarlos, se podrían proponer varias estrategias. Una de las posibilidades sería modificar sintéticamente el AS86 mediante la inclusión de un grupo alquino para utilizar la estrategia de *click chemistry* (274) y poder luego separar a las moléculas de PMCA marcadas con AS86. Dicha estrategia ha sido muy útil para detectar interacciones lípido proteína e involucra la formación de un triazol entre un grupo azida y un alquino catalizada por cobre. En este sentido, Gubbens y col. (72,275) utilizaron la estrategia de *click-chemistry* (274) para identificar proteínas de la membrana interna mitocondrial de *S.cerevisiae* y sus interacciones con fosfolípidos del entorno mediante LC-MS/MS. Brevemente, Gubbens y col. desarrollaron un análogo de fosfatidilcolina con un grupo azido en la cabeza polar y otro en cada cola hidrocarbonada. El primer grupo es el que se une a las proteínas de membrana en el entorno luego de la fotoactivación y los últimos servirían como “anzuelos” incluidos en la membrana que serán luego conjugados con un reactivo fluorescente que porta un grupo alquino (tetrametilrodamina alquino, en este caso) para detectar mediante fluorescencia las proteínas unidas o bien con biotina alquilenos para luego purificar las proteínas unidas. La gran ventaja de esta estrategia es que permite marcar las proteínas en su entorno nativo y luego analizarlas por EM. En nuestro caso, podríamos utilizar PMCA purificada en micelas de detergente o bien aplicar una estrategia similar en membranas enriquecidas con diferentes isoformas de la PMCA, se agrega el AS86 modificado con un grupo alquino, se produce la fotoactivación a 254 nm y quedarán unidas las moléculas de PMCA mediante el grupo azida, el resto se pueden lavar mediante una solución de carbonato (275). Posteriormente se realiza la reacción de *click chemistry* mediante biotina modificada con un grupo azido (que se obtiene comercialmente), y luego se puede incubar con pequeñas esferas que contienen estreptavidina, proceder a la purificación para posterior digestión trípica y análisis por EM. De esta manera, creemos que podría mejorar la abundancia de los péptidos modificados ya que todas las moléculas de PMCA presentes en la muestra tendrán al menos una molécula del reactivo unida.

Como hemos mencionado previamente, la modulación de la PMCA por AGI ha sido menos estudiada que la modulación por fosfolípidos ácidos. En este sentido, los sitios posibles de interacción propuestos para los fosfolípidos ácidos (como fosfatidilserina o fosfatidil inositol) han sido también asociados a los AGI dadas algunas características similares como la presencia de una carga neta negativa a pH fisiológico. A diferencia de las moléculas de fosfatidilcolina (PC), que presentan una cabeza polar zwitteriónica, los sitios de unión de las moléculas que presentan una carga neta negativa se espera que contengan mayor cantidad de residuos aminoácidos polares cargados positivamente ausentes en los bolsillos que unen PC (276). En nuestro estudio, la secuencia propuesta se encontraría cerca de la interfase membrana-citosol pero no es una zona particularmente rica en residuos cargados positivamente y se encuentra ligeramente alejada de una de las zonas propuestas para la interacción de fosfolípidos ácidos (**Figura 9.3**). Por otro lado, en el Capítulo 8, realizamos un experimento que nos permitió demostrar la interacción del AS86 con el dominio de unión a CaM, y posteriormente, hallamos un ión de un fragmento que podría corresponder a una sección del dominio de unión a CaM más 1 molécula de AS8 (**Tabla 9.1**). Con la evidencia existente, no podemos asegurar la existencia de sitios de unión para AGI en la zona del dominio de unión a CaM. En este sentido, tampoco existe un consenso con respecto al sitio de unión para fosfolípidos ácidos en la PMCA. Los sitios propuestos para la unión de fosfolípidos ácidos se encontrarían en la región C-terminal (277) y/o bien, en un bucle citoplasmático que conecta los transmembrana M2 y M3 (123,146). Además, experimentos realizados en nuestro laboratorio mediante la utilización del [¹²⁵I]TID-PC, que permite detectar la exposición de los dominios transmembrana a los lípidos del entorno, refuerzan la idea de un mecanismo de activación por fosfolípidos ácidos independiente del sitio de unión a CaM (68) dado el arreglo diferencial del dominio transmembrana ante el efecto de cada activador. Sin embargo, este último trabajo no descarta directamente la posibilidad de unión de los fosfolípidos ácidos mediante el segmento C-terminal. Algo similar podría ocurrir con los AGI, en particular el AO, que presenten más de un sitio de unión dada la ubicuidad de estas moléculas como mensajeras y que dicha modulación se ejerza como accesoria a la activación por CaM, promoviendo la salida del Ca²⁺ de la célula.

PARTE V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Capítulo 11

Conclusiones

En el presente estudio demostramos que los fosfolípidos neutros modulan la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA. Esta modulación depende ampliamente de la composición de las micelas mixtas (X_{PC}) en las que se incluya la proteína y en las características de las moléculas de PC. La existencia de una transición micela-vesícula en los sistemas de reconstitución provocó una disminución en el *turnover* de la PMCA mediante un efecto directo sobre el tiempo de residencia de la proteína en los intermediarios fosforilados, sugiriendo una menor velocidad de desfosforilación. Por otro lado, en micelas mixtas (sistemas pre-transición) de DMPC o DOPC no hubo efecto sobre los intermediarios fosforilados aunque se observaron marcadas diferencias en los k_p obtenidos en cada sistema. Lo que sugiere que la disminución del k_p en presencia de DOPC podría deberse a la ubicación de varios aminoácidos cargados positivamente que quedarían incluidos en el *core* hidrofóbico. Hallamos que el grosor hidrofóbico óptimo para la PMCA es de 24 Å, en consistencia con la máxima actividad Ca^{2+} -ATPasa alcanzada. En conclusión, proponemos que la modulación diferencial por fosfolípidos neutros podría ser un mecanismo general para regular la función de las proteínas de membrana. En referencia a la modulación de la PMCA por AG insaturados, en este trabajo de tesis pudimos demostrar que el AS86 interactúa no covalentemente con la PMCA promoviendo una conformación más compacta del dominio transmembrana, al igual que el ácido oleico y otros activadores. Además reunimos evidencia que señala que la zona de interacción con CaM podría ser uno de los sitios de acción para los ácidos grasos insaturados. Además, la síntesis y caracterización del AS86 permitieron avances en el estudio de los sitios de interacción de los AGI con la PMCA mediante la estrategia de espectrometría de masas.

El estudio aquí presentado ha logrado abarcar algunos aspectos de la compleja relación lípido-proteína y, a su vez, ha dejado preguntas abiertas para continuar investigando. La continuidad de este tipo de estudios, no sólo con la PMCA como modelo de proteína de membrana compleja, podría dar respuestas a las dificultades en

el abordaje de muchas patologías humanas como la arterioesclerosis, algunas enfermedades infecciosas, la enfermedad de Alzheimer, cáncer, entre otras que presentan un componente lipídico involucrado en su fisiopatología. Un entendimiento molecular de la contribución de los lípidos al proceso que deviene en enfermedad podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias de prevención, diagnóstico y cura.

Perspectivas

Los resultados expuestos y discutidos en esta tesis doctoral abren nuevas perspectivas de trabajo que se proyectan encarando los siguientes objetivos:

- Explorar la influencia en la actividad ATPasa de otras propiedades de los fosfolípidos, como por ejemplo la estructura de las cabezas polares.
- Encarar un estudio más amplio con el empleo de fosfolípidos que presenten una cola saturada y otra insaturada, similar a los fosfolípidos que se encuentran más comúnmente en las membranas biológicas.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular en distintas bicapas y utilizando distintos modelos de conformaciones de la PMCA. De esta manera se complementa el estudio aquí presentado para DMPC y DOPC.
- Realizar experimentos que nos permitan localizar más precisamente por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF) el/los sitio(s) de unión e interacción de los ácidos grasos insaturados con la PMCA.
- Realizar y complementar más experimentos con la estrategia metodológica que incluye la utilización de un espectrómetro con analizador *Orbitrap (Thermo Scientific Q exactive)*, previa separación por un sistema de cromatografía líquida tipo nano-HPLC. La separación mediante el sistema de nano HPLC tiene la ventaja de superar el fenómeno de "apantallamiento" de las señales abundantes sobre las poco abundantes (modificadas) que llegan al detector, mejorando así la relación señal-ruido de dichas señales y permite la fragmentación MS/MS.

PARTE VI

REFERENCIAS

Capítulo 12

Referencias

1. Hedin, L. E., Illergård, K., y Elofsson, A. (2011) An Introduction to Membrane Proteins. *Journal of Proteome Research* **10**, 3324-3331
2. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., y Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996
3. Contreras, F.-X., Ernst, A. M., Wieland, F., y Brügger, B. (2011) Specificity of Intramembrane Protein–Lipid Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a004705
4. Singer, S. J., y Nicolson, G. L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731
5. Fagerberg, L., Jonasson, K., von Heijne, G., Uhlén, M., y Berglund, L. (2010) Prediction of the human membrane proteome. *PROTEOMICS* **10**, 1141-1149
6. Wong, W., y Scott, J. D. (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-970
7. Marsh, D. (2008) Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 1545-1575
8. Jacobson, K., Mouritsen, O. G., y Anderson, R. G. W. (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**, 7-14
9. (2012) Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**, 215-250
10. Hancock, J. F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456-462
11. van Meer, G., Voelker, D. R., y Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124
12. Lindner, R., y Naim, H. Y. (2009) Domains in biological membranes. *Experimental Cell Research* **315**, 2871-2878
13. Bill, R. M., Henderson, P. J. F., Iwata, S., Kunji, E. R. S., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G., y Vogel, H. (2011) Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotech* **29**, 335-340
14. Chill, J. H., y Naider, F. (2011) A solution NMR view of protein dynamics in the biological membrane. *Current Opinion in Structural Biology* **21**, 627-633

15. Lee, A. G. (2003) Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1612**, 1-40
16. Lee, A. G. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 493-500
17. Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., y Sens, P. (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**, 379-385
18. Schatzmann, H. J., y Vincenzi, F. F. (1969) Calcium movements across the membrane of human red cells. *The Journal of Physiology* **201**, 369-395
19. Rega, A., y Garrahan, P. J. (1986) *The Ca²⁺ pump of plasma membranes*, Boca Raton, Florida
20. Seigneuret, M., y Rigaud, J. L. (1986) Analysis of passive and light-driven ion movements in large bacteriorhodopsin liposomes reconstituted by reverse-phase evaporation. 2. Influence of passive permeability and back-pressure effects upon light-induced proton uptake. *Biochemistry* **25**, 6723-6730
21. Seigneuret, M., y Rigaud, J. L. (1986) Analysis of passive and light-driven ion movements in large bacteriorhodopsin liposomes reconstituted by reverse-phase evaporation. 1. Factors governing the passive proton permeability of the membrane. *Biochemistry* **25**, 6716-6722
22. Seigneuret, M., y Rigaud, J.-L. (1985) Use of the fluorescent pH probe pyranine to detect heterogeneous directions of proton movement in bacteriorhodopsin reconstituted large liposomes. *FEBS letters* **188**, 101-106
23. Tang, D., Dean, W. L., Borchman, D., y Paterson, C. A. (2006) The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity. *Cell Calcium* **39**, 209-216
24. Salvador, J. M., Inesi, G., Rigaud, J.-L., y Mata, A. M. (1998) Ca²⁺ Transport by Reconstituted Synaptosomal ATPase Is Associated with H⁺ Countertransport and Net Charge Displacement. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 18230-18234
25. Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., y Lambert, O. (1998) Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *European Biophysics Journal* **27**, 305-319
26. Moroi, Y. (1992) *Micelles: theoretical and applied aspects*, Springer Science & Business Media
27. Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman
28. Tanford, C. (1980) *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, Wiley
29. Gennis, R. B. (2013) *Biomembranes: molecular structure and function*, Springer Science & Business Media

30. Robinson, N. C., y Tanford, C. (1975) Binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5. *Biochemistry* **14**, 369-378
31. Møller, J. V., y le Maire, M. (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18659-18672
32. Levy, D., Gulik, A., Seigneuret, M., y Rigaud, J. L. (1990) Phospholipid vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of the two processes using octaethylene glycol mono-N-dodecyl ether. *Biochemistry* **29**, 9480-9488
33. Almog, S., Kushnir, T., Nir, S., y Lichtenberg, D. (1986) Kinetics and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles. *Biochemistry* **25**, 2597-2605
34. Ollivon, M., Eidelman, O., Blumenthal, R., y Walter, A. (1988) Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octylglucoside. *Biochemistry* **27**, 1695-1703
35. Paternostre, M. T., Roux, M., y Rigaud, J. L. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* **27**, 2668-2677
36. Vinson, P. K., Talmon, Y., y Walter, A. Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. *Biophysical Journal* **56**, 669-681
37. Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **821**, 470-478
38. Silvius, J. R. (1992) Cholesterol modulation of lipid intermixing in phospholipid and glycosphingolipid mixtures. Evaluation using fluorescent lipid probes and brominated lipid quenchers. *Biochemistry* **31**, 3398-3408
39. Seddon, A. M., Curnow, P., y Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 105-117
40. Rigaud, J.-L., Pitard, B., y Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1231**, 223-246
41. Le Maire, M., Kwee, S., Andersen, J. P., y MØller, J. V. (1983) Mode of Interaction of Polyoxyethyleneglycol Detergents with Membrane Proteins. *European Journal of Biochemistry* **129**, 525-532
42. Volwerk, J. J., Mrsny, R. J., Patapoff, T. W., Jost, P. C., y Griffith, O. H. (1987) Multiple equilibria binding treatment of lipid and detergent interactions with membrane

- proteins. Application to cytochrome c oxidase solubilized in cholate. *Biochemistry* **26**, 466-475
43. Haberkant, P., y van Meer, G. (2009) Protein-lipid interactions: paparazzi hunting for snap-shots. in *Biological Chemistry*
 44. Ambroz, H. B., y Kemp, T. J. (1979) Aryl cations - new light on old intermediates. *Chemical Society Reviews* **8**, 353-365
 45. Scaiano, J., y Kim-Thuan, N. (1983) Diazonium salts in photochemistry III: Attempts to characterize aryl cations. *Journal of photochemistry* **23**, 269-276
 46. Singh, A., Thornton, E. R., y Westheimer, F. H. (1962) The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. *Journal of Biological Chemistry* **237**, PC3006-PC3008
 47. Chakrabarti, P., y Khorana, G. (1975) A new approach to the study of phospholipid-protein interactions in biological membranes. Synthesis of fatty acids and phospholipids containing photosensitive groups. *Biochemistry* **14**, 5021-5033
 48. Xia, Y., y Peng, L. (2013) Photoactivatable lipid probes for studying biomembranes by photoaffinity labeling. *Chemical reviews* **113**, 7880-7929
 49. Fleming, S. A. (1995) Chemical reagents in photoaffinity labeling. *Tetrahedron* **51**, 12479-12520
 50. Brunner, J., y Richards, F. M. (1980) Analysis of membranes photolabeled with lipid analogues. Reaction of phospholipids containing a disulfide group and a nitrene or carbene precursor with lipids and with gramicidin A. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 3319-3329
 51. Schrock, A. K., y Schuster, G. B. (1984) Photochemistry of phenyl azide: chemical properties of the transient intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **106**, 5228-5234
 52. Reiser, A., y Leyshon, L. (1970) Correlation between negative charge on nitrogen and the reactivity of aromatic nitrenes. *Journal of the American Chemical Society* **92**, 7487-7487
 53. POE, S., SCHANPP, K., Young, M. J., Grayzar, J., y Platz, M. S. (1992) Chemistry and kinetics of singlet (pentafluorophenyl) nitrene. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 5054-5067
 54. Kemnitz, C. R., Karney, W. L., y Borden, W. T. (1998) Why are nitrenes more stable than carbenes? An ab initio study. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 3499-3503
 55. Brunner, J. (1993) New photolabeling and crosslinking methods. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 483-514
 56. Blencowe, A., y Hayes, W. (2005) Development and application of diazirines in biological and synthetic macromolecular systems. *Soft Matter* **1**, 178-205

57. Bayley, H., y Knowles, J. R. (1978) Photogenerated reagents for membrane labeling. 2. Phenylcarbene and adamantylidene formed within the lipid bilayer. *Biochemistry* **17**, 2420-2423
58. Brunner, J., Senn, H., y Richards, F. (1980) 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 3313-3318
59. Hashimoto, M., y Hatanaka, Y. (2008) Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *European journal of organic chemistry* **2008**, 2513-2523
60. Molinari, M., Galli, C., de Bernard, M., Norais, N., Ruyschaert, J.-M., Rappuoli, R., y Montecucco, C. (1998) The Acid Activation of Helicobacter pylori Toxin VacA: Structural and Membrane Binding Studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **248**, 334-340
61. Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Glück, R., Vorherr, T., y Brunner, J. (1996) H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13417-13421
62. Castello, P. R., Caride, A. J., Flecha, F. L. G., Fernandez, H. N., Rossi, J. P., y Delfino, J. M. (1994) Identification of transmembrane domains of the red cell calcium pump with a new photoactivatable phospholipidic probe. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 194-200
63. Castello, P. R., Flecha, F., Caride, A. J., Delfino, J. M., y Rossi, J. (1997) The membrane topology of the amino-terminal domain of the red cell calcium pump. *Protein Science* **6**, 1708-1717
64. van Voorst, F., van der Does, C., Brunner, J., Driessen, A. J., y de Kruijff, B. (1998) Translocase-bound SecA is largely shielded from the phospholipid acyl chains. *Biochemistry* **37**, 12261-12268
65. Giraldo, A. M. V., Castello, P. R., Flecha, F., Moeller, J. V., Delfino, J. M., y Rossi, J. P. F. (2006) Stoichiometry of lipid-protein interaction assessed by hydrophobic photolabeling. *FEBS Letters* **580**, 607-612
66. Mangialavori, I., Giraldo, A. M. V., Buslje, C. M., Gomes, M. F., Caride, A. J., y Rossi, J. P. F. C. (2009) A New Conformation in Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump and Plasma Membrane Ca²⁺ Pumps Revealed by a Photoactivatable Phospholipidic Probe. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4823-4828
67. Mangialavori, I., Montes, M. R., Rossi, R. C., Fedosova, N. U., y Rossi, J. P. F. C. (2011) Dynamic lipid-protein stoichiometry on E1 and E2 conformations of the Na⁺/K⁺-ATPase. *FEBS Letters* **585**, 1153-1157
68. Mangialavori, I., Villamil-Giraldo, A. M., Pignataro, M. F., Ferreira-Gomes, M., Caride, A. J., y Rossi, J. P. F. C. (2011) Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA) Differential Exposure of Hydrophobic Domains after Calmodulin and Phosphatidic Acid Activation. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 18397-18404

69. Mangialavori, I. C., Ferreira-Gomes, M. S., Saffioti, N. A., González-Lebrero, R. M., Rossi, R. C., y Rossi, J. P. F. C. (2013) Conformational Changes Produced by ATP Binding to the Plasma Membrane Calcium Pump. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 31030-31041
70. Janssen, M. J., van Voorst, F., Ploeger, G. E., Larsen, P. M., Larsen, M. R., de Kroon, A. I., y de Kruijff, B. (2002) Photolabeling identifies an interaction between phosphatidylcholine and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gut2p) in yeast mitochondria. *Biochemistry* **41**, 5702-5711
71. Weber, T., y Brunner, J. (1995) 2-(Tributylstannyl)-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzyl Alcohol: A Building Block for Photolabeling and Crosslinking Reagents of Very High Specific Radioactivity. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 3084-3095
72. Gubbens, J., y de Kroon, A. I. (2010) Proteome-wide detection of phospholipid–protein interactions in mitochondria by photocrosslinking and click chemistry. *Molecular BioSystems* **6**, 1751-1759
73. Shi, Y., Xiang, R., Horváth, C., y Wilkins, J. A. (2004) The role of liquid chromatography in proteomics. *Journal of Chromatography A* **1053**, 27-36
74. Pasini, E. M., Lutz, H. U., Mann, M., y Thomas, A. W. (2010) Red blood cell (RBC) membrane proteomics—Part I: Proteomics and RBC physiology. *Journal of proteomics* **73**, 403-420
75. Gubbens, J., Vader, P., Damen, J. M. A., O'Flaherty, M. C., Slijper, M., de Kruijff, B., y de Kroon, A. I. (2007) Probing the membrane interface-interacting proteome using photoactivatable lipid cross-linkers. *Journal of Proteome Research* **6**, 1951-1962
76. Horváth, L. I. (1994) Spin-label ESR study of molecular dynamics of lipid/protein association in membranes. in *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes*, Springer. pp 205-245
77. Poveda, J., Fernández, A., Encinar, J., y Gonzalez-Ros, J. (2008) Protein-promoted membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1778**, 1583-1590
78. Hite, R. K., Li, Z., y Walz, T. (2010) Principles of membrane protein interactions with annular lipids deduced from aquaporin-0 2D crystals. *The EMBO Journal* **29**, 1652-1658
79. Petrache, H. I., Feller, S. E., y Nagle, J. F. (1997) Determination of component volumes of lipid bilayers from simulations. *Biophysical Journal* **72**, 2237-2242
80. Hoffmann, B., Stöckl, A., Schlame, M., Beyer, K., y Klingenberg, M. (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1940-1944
81. Shrivastava, I. H., Capener, C. E., Forrest, L. R., y Sansom, M. S. P. (2000) Structure and Dynamics of K Channel Pore-Lining Helices: A Comparative Simulation Study. *Biophysical Journal* **78**, 79-92

82. Belohorcova, K., Qian, J., y Davis, J. H. (2000) Molecular dynamics and ²H-NMR study of the influence of an amphiphilic peptide on membrane order and dynamics. *Biophysical Journal* **79**, 3201-3216
83. Lee, A. G. (2011) Lipid-protein interactions. *Biochemical Society transactions* **39**, 761-766
84. Mouritsen, O. G., y Bloom, M. (1993) Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**, 145-171
85. Jensen, M. Ø., y Mouritsen, O. G. (2004) Lipids do influence protein function—the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1666**, 205-226
86. Marsh, D. (2007) Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys. J.* **93**, 3884-3899
87. Cantor, R. S. (1999) The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chemistry and physics of lipids* **101**, 45-56
88. Seddon, J. M., Kaye, R., y Marsh, D. (1983) Induction of the lamellar-inverted hexagonal phase transition in cardiolipin by protons and monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **734**, 347-352
89. Marsh, D., y Seddon, J. M. (1982) Gel-to-inverted hexagonal (Lβ-HII) phase transitions in phosphatidylethanolamines and fatty acid-phosphatidylcholine mixtures, demonstrated by ³¹P-NMR spectroscopy and X-ray diffraction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **690**, 117-123
90. Hildebrandt, P., Heimburg, T., Marsh, D., y Powell, G. L. (1990) Conformational changes in cytochrome c and cytochrome oxidase upon complex formation: a resonance Raman study. *Biochemistry* **29**, 1661-1668
91. Berridge, M. J., Bootman, M. D., y Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**, 517-529
92. Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., y Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**, 259-263
93. Broad, L. M., Cannon, T. R., y Taylor, C. W. (1999) A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major Ca²⁺ entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *The Journal of Physiology* **517**, 121-134
94. Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., y Muallem, S. (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478-482
95. Cancela, J. M., Churchill, G. C., y Galione, A. (1999) Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* **398**, 74-76

96. Meldolesi, J., y Pozzan, T. (1987) Pathways of Ca^{2+} influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Experimental Cell Research* **171**, 271-283
97. Parys, J. B., y De Smedt, H. (2012) Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Its Receptors. in *Calcium Signaling* (Islam, M. S. ed.), Springer Netherlands, Dordrecht. pp 255-279
98. Van Petegem, F. (2012) Ryanodine receptors: structure and function. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31624-31632
99. Carafoli, E. (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *The FASEB Journal* **8**, 993-1002
100. Penniston, J., y Enyedi, A. (1998) Modulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Journal of Membrane Biology* **165**, 101-109
101. Bautista, D. M., Hoth, M., y Lewis, R. S. (2002) Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *The Journal of Physiology* **541**, 877-894
102. Toescu, E. C., y Petersen, O. H. (1995) Region-specific activity of the plasma membrane Ca^{2+} pump and delayed activation of Ca^{2+} entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca^{2+} signals in exocrine cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8528-8535
103. Monteith, G., y Roufogalis, B. (1995) The plasma membrane calcium pump-a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium* **18**, 459-470
104. Thayer, S. A., Usachev, Y. M., y Pottorf, W. J. (2002) Modulating Ca^{2+} clearance from neurons. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **7**, d1255-1279
105. Schatzmann, H. (1973) Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. *The Journal of Physiology* **235**, 551
106. Rossi, J., y Schatzmann, H. (1982) Is the red cell calcium pump electrogenic? *The Journal of Physiology* **327**, 1-15
107. Hao, L., Rigaud, J.-L., y Inesi, G. (1994) $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 14268-14275
108. Krebs, J., Vasak, M., Scarpa, A., y Carafoli, E. (1987) Conformational differences between the E1 and E2 states of the calcium adenosinetriphosphatase of the erythrocyte plasma membrane as revealed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **26**, 3921-3926
109. Axelsen, K. B., y Palmgren, M. G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution* **46**, 84-101
110. Ferreira-Gomes, M. S., González-Lebrero, R. M., de la Fuente, M. C., Strehler, E. E., Rossi, R. C., y Rossi, J. P. F. C. (2011) Calcium Occlusion in Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 32018-32025

111. Niggli, V., Adunyah, E. S., y Carafoli, E. (1981) Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 8588-8592
112. Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G., y Carafoli, E. (1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 6425-6430
113. Richards, D. E., Rega, A. F., y Garrahan, P. J. (1978) Two classes of site for ATP in the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochimica et biophysica acta* **511**, 194-201
114. Mualem, S., y Karlsh, S. J. (1979) Is the red cell calcium pump regulated by ATP? *Nature* **277**, 238-240
115. Reinila, M., MacDonald, E., Salem, N., Linnoila, M., y Trams, E. G. (1982) Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. *Analytical Biochemistry* **124**, 19-26
116. Garrahan, P., y Rega, A. (1978) Activation of partial reactions of the Ca^{2+} -ATPase from human red cells by Mg^{2+} and ATP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **513**, 59-65
117. Rega, A. F., y Garrahan, P. J. (1975) Calcium ion-dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes. *Journal of Membrane Biology* **22**, 313-327
118. Shull, G. E., y Greeb, J. (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na^{+} , K^{+} -and other cation transport ATPases. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 8646-8657
119. Verma, A., Filoteo, A., Stanford, D., Wieben, E. D., Penniston, J., Strehler, E. E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., y Mathews, S. (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 14152-14159
120. Knauf, P. A., Proverbio, F., y Hoffman, J. F. (1974) Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca -ATPase and Na , K -ATPase in human red cell ghosts. *The Journal of general physiology* **63**, 324-336
121. Strehler, E. E., y Zacharias, D. A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological reviews* **81**, 21-50
122. Enyedi, A., Verma, A. K., Filoteo, A. G., y Penniston, J. T. (1993) A highly active 120-kDa truncated mutant of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 10621-10626
123. Pinto, F. d. T., y Adamo, H. P. (2002) Deletions in the Acidic Lipid-binding Region of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump: A MUTANT WITH HIGH AFFINITY FOR Ca^{2+} RESEMBLING THE ACIDIC LIPID-ACTIVATED ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 12784-12789

124. Tidow, H., Hein, K. L., Baekgaard, L., Palmgren, M. G., y Nissen, P. (2010) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of calmodulin in complex with the regulatory domain of the plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase ACA8. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **66**, 361-363
125. Strehler, E. E. (2015) Plasma membrane calcium ATPases: From generic Ca^{2+} sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular Ca^{2+} . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**, 26-33
126. Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., y Carafoli, E. (2008) The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 65-74
127. Krebs, J. (2015) The plethora of PMCA isoforms: alternative splicing and differential expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1853**, 2018-2024
128. Brini, M., y Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews* **89**, 1341-1378
129. Falchetto, R., Vorherr, T., y Carafoli, E. (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Science* **1**, 1613-1621
130. Kessler, F., Falchetto, R., Heim, R., Meili, R., Vorherr, T., Strehler, E. E., y Carafoli, E. (1992) Study of calmodulin binding to the alternatively spliced C-terminal domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Biochemistry* **31**, 11785-11792
131. Caride, A. J., Elwess, N. L., Verma, A. K., Filoteo, A. G., Enyedi, Á., Bajzer, Ž., y Penniston, J. T. (1999) The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} pump is slow and is changed by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 35227-35232
132. Elwess, N. L., Filoteo, A. G., Enyedi, A., y Penniston, J. T. (1997) Plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca^{2+} . *Journal of Biological Chemistry* **272**, 17981-17986
133. Caride, A. J., Filoteo, A. G., Penheiter, A. R., Pászty, K., Enyedi, Á., y Penniston, J. T. (2001) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca^{2+} : fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium* **30**, 49-57
134. Caride, A. J., Penheiter, A. R., Filoteo, A. G., Bajzer, Z., Enyedi, Á., y Penniston, J. T. (2001) The Plasma Membrane Calcium Pump Displays Memory of Past Calcium Spikes: DIFFERENCES BETWEEN ISOFORMS 2b AND 4b. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 39797-39804
135. Strehler, E. E., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Xiong, Y., Penniston, J. T., y Enyedi, A. (2007) Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1099**, 226-236

136. Wang, K. K., Villalobo, A., y Roufogalis, B. D. (1992) The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter. *Trends in cell biology* **2**, 46-52
137. Lehotský, J. (1995) Plasma membrane Ca^{2+} -pump functional specialization in the brain. *Molecular and chemical neuropathology* **25**, 175
138. Lehotsky, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Wuytack, F., De Smedt, H., y Casteels, R. (1992) Stimulation of the catalytic cycle of the Ca^{2+} pump of porcine plasma-membranes by negatively charged phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1105**, 118-124
139. Lopreiato, R., Giacomello, M., y Carafoli, E. (2014) The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 10261-10268
140. Ficarella, R., Di Leva, F., Bortolozzi, M., Ortolano, S., Donaudy, F., Petrillo, M., Melchionda, S., Lelli, A., Domi, T., y Fedrizzi, L. (2007) A functional study of plasma-membrane calcium-pump isoform 2 mutants causing digenic deafness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1516-1521
141. Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Shull, G. E., y Horst, R. L. (2004) Null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2 impairs calcium transport into milk. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42369-42373
142. Strehler, E. E., y Treiman, M. (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Current molecular medicine* **4**, 323-335
143. Ronner, P., Gazzotti, P., y Carafoli, E. (1977) A lipid requirement for the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated ATPase of erythrocyte membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **179**, 578-583
144. Enyedi, A., Elwess, N. L., Filoteo, A. G., Verma, A. K., Paszty, K., y Penniston, J. T. (1997) Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27525-27528
145. Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., Modyanov, N., y Carafoli, E. (1990) Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry* **29**, 8070-8076
146. Filoteo, A. G., Enyedi, A., y Penniston, J. T. (1992) The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca^{2+} pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 11800-11805
147. Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., y Carafoli, E. (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *European Journal of Biochemistry* **204**, 939-946
148. Brini, M., Di Leva, F., Ortega, C. K., Domi, T., Ottolini, D., Leonardi, E., Tosatto, S. C. E., y Carafoli, E. (2010) Deletions and Mutations in the Acidic Lipid-binding Region of the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump: A STUDY ON DIFFERENT SPLICING VARIANTS OF ISOFORM 2. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 30779-30791

149. de Tezanos Pinto, F., y Adamo, H. P. (2006) Deletions in the A L region of the h4xb plasma membrane Ca²⁺ pump: High apparent affinity for Ca²⁺ of a deletion mutant resembling the alternative spliced form h4zb. *FEBS Letters* **580**, 1576-1580
150. Penniston, J. T., Padányi, R., Pászty, K., Varga, K., Hegedűs, L., y Enyedi, A. (2014) Apart from its known function, the plasma membrane Ca²⁺ ATPase can regulate Ca²⁺ signaling by controlling phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate levels. *J Cell Sci* **127**, 72-84
151. Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vrolix, M., De Smedt, H., y Casteels, R. (1989) Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochemical Journal* **263**, 687-694
152. Missiaen, L., Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Smedt, H., y Casteels, R. (1989) Polyamines and neomycin inhibit the purified plasma-membrane Ca²⁺ pump by interacting with associated polyphosphoinositides. *Biochemical Journal* **261**, 1055-1058
153. Sarkadi, B., Enyedi, Á., Nyers, Á., y Gardos, G. (1982) The function and regulation of the calcium pump in the erythrocyte membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences* **402**, 329-348
154. Davis, F. B., Davis, P. J., Blas, S., y Schoenl, M. (1987) Action of long-chain fatty acids in vitro on Ca²⁺-stimulatable, Mg²⁺-dependent ATPase activity in human red cell membranes. *Biochemical Journal* **248**, 511-516
155. Randriamampita, C., y Trautmann, A. (1990) Arachidonic acid activates Ca²⁺ extrusion in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 18059-18062
156. Oliveira, V. H., Nascimento, K. S., Freire, M. M., Moreira, O. C., Scofano, H. M., Barrabin, H., y Mignaco, J. A. (2008) Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase by arachidonic acid. *Prostaglandins & other lipid mediators* **87**, 47-53
157. Van Meer, G., Voelker, D. R., y Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**, 112-124
158. Hwang, T.-L., Su, Y.-C., Chang, H.-L., Leu, Y.-L., Chung, P.-J., Kuo, L.-M., y Chang, Y.-J. (2009) Suppression of superoxide anion and elastase release by C18 unsaturated fatty acids in human neutrophils. *Journal of lipid research* **50**, 1395-1408
159. James, P. H., Pruschy, M., Vorherr, T. E., Penniston, J. T., y Carafoli, E. (1989) Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* **28**, 4253-4258
160. Enyedi, A., Verma, A. K., Filoteo, A. G., y Penniston, J. T. (1996) Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32461-32467

161. Verma, A. K., Paszty, K., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., y Enyedi, A. (1999) Protein kinase C phosphorylates plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4a at its calmodulin binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 527-531
162. Dean, W. L., Chen, D., Brandt, P. C., y Vanaman, T. C. (1997) Regulation of platelet plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15113-15119
163. Stieger, J., y Schatzmann, H. (1981) Metal requirement of the isolated red cell Ca-pump ATPase after elimination of calmodulin dependence by trypsin attack. *Cell Calcium* **2**, 601-616
164. James, P., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D., Penniston, J., De Flora, A., y Carafoli, E. (1989) Modulation of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 8289-8296
165. Pászty, K., Verma, A. K., Padányi, R., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., y Enyedi, Á. (2002) Plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 6822-6829
166. Minocherhomjee, A., Beauregard, G., Potier, M., y Roufogal, B. (1983) The molecular weight of the calcium-transport-ATPase of the human red blood cell determined by radiation inactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **116**, 895-900
167. Cavieres, J. (1984) Calmodulin and the target size of the $(\text{Ca}^{2++} \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of human red-cell ghosts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **771**, 241-244
168. Kosk-Kosicka, D., y Bzdega, T. (1988) Activation of the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 18184-18189
169. Fujimoto, T. (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *Journal of Cell Biology* **120**, 1147-1147
170. Vorherr, T., Kessler, T., Hofmann, F., y Carafoli, E. (1991) The calmodulin-binding domain mediates the self-association of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 22-27
171. Kosk-Kosicka, D., Bzdega, T., y Wawrzynow, A. (1989) Fluorescence energy transfer studies of purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. Ca^{2+} -regulated activation by oligomerization. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 19495-19499
172. Chaudhary, J., Walia, M., Matharu, J., Escher, E., y Grover, A. K. (2001) Caloxin: a novel plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **280**, C1027-C1030
173. Szewczyk, M. M., Pande, J., Akolkar, G., y Grover, A. K. (2010) Caloxin 1b3: A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump isoform 1 selective inhibitor that increases cytosolic Ca^{2+} in endothelial cells. *Cell Calcium* **48**, 352-357

174. Gatto, C., Hale, C. C., Xu, W., y Milanick, M. A. (1995) Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry* **34**, 965-972
175. Schatzmann, H. J., y Bürgin, H. (1978) CALCIUM IN HUMAN RED BLOOD CELLS. *Annals of the New York Academy of Sciences* **307**, 125-147
176. Szász, I., Hasitz, M., Sarkadi, B., y Gárdos, G. (1978) Phosphorylation of the Ca²⁺ pump intermediate in intact red cells, isolated membranes and inside-out vesicles. *Mol Cell Biochem* **22**, 147-152
177. Mohamed, T. M., Abou-Leisa, R., Baudoin, F., Stafford, N., Neyses, L., Cartwright, E. J., y Oceandy, D. (2013) Development and characterization of a novel fluorescent indicator protein PMCA4-GCaMP2 in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **63**, 57-68
178. Gonzalez, R. G., Haxo, R. S., y Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry* **19**, 4299-4303
179. Li, M., Allen, A., y Smith, T. J. (2007) High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors. *Biochemistry* **46**, 15089-15102
180. Tan, G. S., Chiu, C.-H., Garchow, B. G., Metzler, D., Diamond, S. L., y Kiriakidou, M. (2011) Small molecule inhibition of RISC loading. *ACS chemical biology* **7**, 403-410
181. Rimessi, A., Coletto, L., Pinton, P., Rizzuto, R., Brini, M., y Carafoli, E. (2005) Inhibitory interaction of the 14-3-3 ϵ protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase pump. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 37195-37203
182. Monesterolo, N. E., Santander, V. S., Campetelli, A. N., Arce, C. A., Barra, H. S., y Casale, C. H. (2008) Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS journal* **275**, 3567-3579
183. Okunade, G. W., Miller, M. L., Pyne, G. J., Sutliff, R. L., O'Connor, K. T., Neumann, J. C., Andringa, A., Miller, D. A., Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R. J., y Shull, G. E. (2004) Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 33742-33750
184. Cho, Y. S., Go, M. J., Kim, Y. J., Heo, J. Y., Oh, J. H., Ban, H.-J., Yoon, D., Lee, M. H., Kim, D.-J., Park, M., Cha, S.-H., Kim, J.-W., Han, B.-G., Min, H., Ahn, Y., Park, M. S., Han, H. R., Jang, H.-Y., Cho, E. Y., Lee, J.-E., Cho, N. H., Shin, C., Park, T., Park, J. W., Lee, J.-K., Cardon, L., Clarke, G., McCarthy, M. I., Lee, J.-Y., Lee, J.-K., Oh, B., y Kim, H.-L. (2009) A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet* **41**, 527-534
185. Studies, I. C. f. B. P. G.-W. A. (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* **478**, 103-109

186. Kobayashi, Y., Hirawa, N., Tabara, Y., Muraoka, H., Fujita, M., Miyazaki, N., Fujiwara, A., Ichikawa, Y., Yamamoto, Y., Ichihara, N., Saka, S., Wakui, H., Yoshida, S.-i., Yatsu, K., Toya, Y., Yasuda, G., Kohara, K., Kita, Y., Takei, K., Goshima, Y., Ishikawa, Y., Ueshima, H., Miki, T., y Umemura, S. (2012) Mice Lacking Hypertension Candidate Gene ATP2B1 in Vascular Smooth Muscle Cells Show Significant Blood Pressure Elevation. *Hypertension* **59**, 854-860
187. Little, R., Cartwright, E. J., Neyses, L., y Austin, C. (2016) Plasma membrane calcium ATPases (PMCAs) as potential targets for the treatment of essential hypertension. *Pharmacology & therapeutics* **159**, 23-34
188. Street, V. A., McKee-Johnson, J. W., Fonseca, R. C., Tempel, B. L., y Noben-Trauth, K. (1998) Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nature genetics* **19**, 390-394
189. Greeb, J., y Shull, G. (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 18569-18576
190. Williams, T. A., Monticone, S., Schack, V. R., Stindl, J., Burrello, J., Buffolo, F., Annaratone, L., Castellano, I., Beuschlein, F., y Reincke, M. (2014) Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas Novelty and Significance. *Hypertension* **63**, 188-195
191. Beuschlein, F., Boulkroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H. N., Lichtenauer, U. D., Penton, D., Schack, V. R., Amar, L., Fischer, E., Walther, A., Tauber, P., Schwarzmayer, T., Diener, S., Graf, E., Allolio, B., Samson-Couterie, B., Benecke, A., Quinkler, M., Fallo, F., Plouin, P.-F., Mantero, F., Meitinger, T., Mulatero, P., Jeunemaitre, X., Warth, R., Vilsen, B., Zennaro, M.-C., Strom, T. M., y Reincke, M. (2013) Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet* **45**, 440-444
192. Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V. M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., Montecchi-Palazzi, L., Hu, H., Chelly, J., Bertini, E., Brini, M., y Carafoli, E. (2012) Mutation of plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca^{2+} homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 14514-14519
193. Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., O'ceandy, D., Knobloch, K.-P., y Neyses, L. (2004) Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28220-28226
194. Li, M., Ho, P. W.-L., Pang, S. Y.-Y., Tse, Z. H.-M., Kung, M. H.-W., Sham, P.-C., y Ho, S.-L. (2014) PMCA4 (ATP2B4) Mutation in Familial Spastic Paraplegia. *PLoS ONE* **9**, e104790
195. Sonntag, Y., Musgaard, M., Olesen, C., Schiøtt, B., Møller, J. V., Nissen, P., y Thøgersen, L. (2011) Mutual adaptation of a membrane protein and its lipid bilayer during conformational changes. *Nat Commun* **2**, 304

196. Raunser, S., y Walz, T. (2009) Electron crystallography as a technique to study the structure on membrane proteins in a lipidic environment. *Annual review of biophysics* **38**, 89-105
197. Reichow, S. L., y Gonen, T. (2009) Lipid–protein interactions probed by electron crystallography. *Current Opinion in Structural Biology* **19**, 560-565
198. Wallin, E., y Heijne, G. V. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science* **7**, 1029-1038
199. Rossi, J., Delfino, J. M., Caride, A. J., y Fernandez, H. N. (1995) Interaction of unsaturated fatty acids with the red blood cell Ca^{2+} -ATPase. Studies with a novel photoactivatable probe. *Biochemistry* **34**, 3802-3812
200. González Flecha, F., Castello, P., Gagliardino, J., y Rossi, J. (1999) Molecular characterization of the glycosylated plasma membrane calcium pump. *Journal of Membrane Biology* **171**, 25-34
201. Roufogalis, B. D., Akyempon, C. K., y Al-Jobore, A. (1982) Regulation of the Ca^{2+} pump of the erythrocyte membrane. *Annals of the New York Academy of Sciences* **402**, 349-367
202. Strehler, E. E., James, P., Fischer, R., Heim, R., Vorherr, T., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., y Carafoli, E. (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2835-2842
203. Schagger, H., y Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379
204. Chen, S.-H., Bubb, M. R., Yarmola, E. G., Zuo, J., Jiang, J., Lee, B. S., Lu, M., Gluck, S. L., Hurst, I. R., y Holliday, L. S. (2004) Vacuolar H^{+} -ATPase Binding to Microfilaments REGULATION IN RESPONSE TO PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE ACTIVITY AND DETAILED CHARACTERIZATION OF THE ACTIN-BINDING SITE IN SUBUNIT B. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7988-7998
205. Fiske, C. H., y Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. biol. Chem* **66**, 375-400
206. Bers, D. M. (1982) A simple method for the accurate determination of free $[\text{Ca}]$ in Ca-EGTA solutions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **242**, C404-C408
207. Echarte, M. a. M., Levi, V., Villamil, A. M. a., Rossi, R. C., y Rossi, J. P. F. C. (2001) Quantitation of Plasma Membrane Calcium Pump Phosphorylated Intermediates by Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **289**, 267-273
208. Culbertson, C. T., Jacobson, S. C., y Michael Ramsey, J. (2002) Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta* **56**, 365-373
209. Haustein, E., y Schwille, P. (2003) Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 153-166

210. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., y Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1701-1718
211. Schmidt, T. H., y Kandt, C. (2012) LAMBADA and InflateGRO2: Efficient Membrane Alignment and Insertion of Membrane Proteins for Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **52**, 2657-2669
212. Feenstra, K. A., Hess, B., y Berendsen, H. J. C. (1999) Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *Journal of Computational Chemistry* **20**, 786-798
213. Atlasovich, F., Santomé, J. A., y Fernández, H. N. (1993) Photoreactive fatty acid analogues that bind to the rat liver fatty-acid binding protein: 11-(5'-azido-salicylamido)-undecanoic acid derivatives. *Mol Cell Biochem* **120**, 15-23
214. Juranic, N., Atanasova, E., Filoteo, A. G., Macura, S., Prendergast, F. G., Penniston, J. T., y Strehler, E. E. (2010) Calmodulin wraps around its binding domain in the plasma membrane Ca^{2+} pump anchored by a novel 18-1 motif. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 4015-4024
215. Ball, E. H. (1986) Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **155**, 23-27
216. Drapeau, G. R. (1977) [21] Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. *Methods in enzymology* **47**, 189-191
217. Fraser, R., Suzuki, E., y Leach, S. (1973) Physical principles and techniques of protein chemistry. *Part C, ed. SJ Leach, Academic Press, NY*, 301
218. Levi, V., Rossi, J. P. F. C., Echarte, M. M., Castello, P. R., y González Flecha, F. L. (2000) Thermal Stability of the Plasma Membrane Calcium Pump. Quantitative Analysis of Its Dependence on Lipid-Protein Interactions. *J. Membrane Biol.* **173**, 215-225
219. Dodes Traian, M. M., Cattoni, D. I., Levi, V., y González Flecha, F. L. (2012) A Two-Stage Model for Lipid Modulation of the Activity of Integral Membrane Proteins. *PLoS ONE* **7**, e39255
220. Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B., y Lawrence, M. J. (2000) Light-scattering investigations on dilute nonionic oil-in-water microemulsions. *The AAPS Journal* **2**, 16-26
221. Almog, S., Litman, B. J., Wimley, W., Cohen, J., Wachtel, E. J., Barenholz, Y., Ben-Shaul, A., y Lichtenberg, D. (1990) States of aggregation and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry* **29**, 4582-4592
222. Jackson, M. L., Schmidt, C. F., Lichtenberg, D., Litman, B. J., y Albert, A. D. (1982) Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry* **21**, 4576-4582

223. Vinson, P. K., Talmon, Y., y Walter, A. (1989) Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. *Biophysical Journal* **56**, 669-681
224. Xu, R. (2002) Electrophoretic light scattering: Zeta potential measurement. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*, 289-343
225. Digman, M. A., y Gratton, E. (2011) Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. *Annual review of physical chemistry* **62**, 645-668
226. Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, R. W., y Pfeiffer, D. R. (1994) Ca^{2+} transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophysical journal* **66**, 1678-1693
227. Pressman, B. C. (1976) Biological applications of ionophores. *Annual review of biochemistry* **45**, 501-530
228. Sarkadi, B., Enyedi, A., Földes-Papp, Z., y Gardos, G. (1986) Molecular characterization of the in situ red cell membrane calcium pump by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 9552-9557
229. Reed, P. W., y Lardy, H. A. (1972) A23187: a divalent cation ionophore. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 6970-6977
230. Luterbacher, S., y Schatzmann, H. (1983) The site of action of La^{3+} in the reaction cycle of the human red cell membrane Ca^{2+} -pump ATPase. *Cellular and Molecular Life Sciences* **39**, 311-312
231. Herscher, C. J., y Rega, A. F. (1996) Pre-steady-state kinetic study of the mechanism of inhibition of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by lanthanum. *Biochemistry* **35**, 14917-14922
232. Echarte, M. M., Rossi, R. C., y Rossi, J. P. F. C. (2007) Phosphorylation of the Plasma Membrane Calcium Pump at High ATP Concentration. On the Mechanism of ATP Hydrolysis†. *Biochemistry* **46**, 1034-1041
233. Mangialavori, I., Ferreira-Gomes, M., Pignataro, M. F., Strehler, E. E., y Rossi, J. P. F. C. (2010) Determination of the Dissociation Constants for Ca^{2+} and Calmodulin from the Plasma Membrane Ca^{2+} Pump by a Lipid Probe That Senses Membrane Domain Changes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 123-130
234. Echarte, M. M., Rossi, R. C., y Rossi, J. P. F. (2007) Phosphorylation of the plasma membrane calcium pump at high ATP concentration. On the mechanism of ATP hydrolysis. *Biochemistry* **46**, 1034-1041
235. Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B., y Lawrence, M. J. (2000) Light scattering investigations on dilute nonionic oil-in-water microemulsions. *AAPS pharmSci* **2**, E12
236. Katz, S., y Blostein, R. (1975) Ca^{2+} -stimulated membrane phosphorylation and ATPase activity of the human erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **389**, 314-324

237. Lichtner, R., y Wolf, H. U. (1980) Phosphorylation of the isolated high-affinity (Ca^{2+} Mg^{2+})-ATPase of the human erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **598**, 472-485
238. Bredeston, L. M. (2002) Pre-steady-state phosphorylation and dephosphorylation of detergent-purified plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase. *Biochemical Journal* **361**, 355-361
239. Lee, A. G. (2002) Ca^{2+} -ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1565**, 246-266
240. Haviv, H., Habeck, M., Kanai, R., Toyoshima, C., y Karlish, S. J. (2013) Neutral Phospholipids Stimulate Na, K-ATPase Activity A SPECIFIC LIPID-PROTEIN INTERACTION. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 10073-10081
241. Sines, J. J., y Hackney, D. D. (1987) A residence-time analysis of enzyme kinetics. *The Biochemical journal* **243**, 159-164
242. Starling, A. P., East, J. M., y Lee, A. (1995) Effects of phospholipid fatty acyl chain length on phosphorylation and dephosphorylation of the Ca^{2+} -ATPase. *Biochemical Journal* **310**, 875-879
243. Sonntag, Y., Musgaard, M., Olesen, C., Schiøtt, B., Møller, J. V., Nissen, P., y Thøgersen, L. (2011) Mutual adaptation of a membrane protein and its lipid bilayer during conformational changes. *Nature communications* **2**, 304
244. Enyedi, A., Vorherr, T., James, P., McCormick, D. J., Filoteo, A., Carafoli, E., y Penniston, J. (1989) The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 12313-12321
245. Caride, A. J., Filoteo, A. G., Enyedi, A., Verma, A. K., y Penniston, J. T. (1996) Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochemical Journal* **316**, 353-359
246. Penniston, J. T., Padányi, R., Pászty, K., Varga, K., Hegedűs, L., y Enyedi, A. (2014) Apart from its known function, the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase can regulate Ca^{2+} signaling by controlling phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *Journal of Cell Science* **127**, 72-84
247. Haberkant, P., y Holthuis, J. C. (2014) Fat & fabulous: bifunctional lipids in the spotlight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**, 1022-1030
248. Barrera, N. P., y Robinson, C. V. (2011) Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes. *Annual review of biochemistry* **80**, 247-271
249. Mann, M., Hendrickson, R. C., y Pandey, A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry* **70**, 437-473

250. Müller, K. (1981) Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structure analysis. *Biochemistry* **20**, 404-414
251. Dürr, U. H., Soong, R., y Ramamoorthy, A. (2013) When detergent meets bilayer: birth and coming of age of lipid bicelles. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* **69**, 1-22
252. Booth, P. J., Riley, M. L., Flitsch, S. L., Templer, R. H., Farooq, A., Curran, A. R., Chadborn, N., y Wright, P. (1997) Evidence that bilayer bending rigidity affects membrane protein folding. *Biochemistry* **36**, 197-203
253. Curran, A. R., Templer, R. H., y Booth, P. J. (1999) Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. *Biochemistry* **38**, 9328-9336
254. Roman, E. A., y González Flecha, F. L. (2014) Kinetics and thermodynamics of membrane protein folding. *Biomolecules* **4**, 354-373
255. Edwards, K., Almgren, M., Bellare, J., y Brown, W. (1989) Effects of Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. *Langmuir* **5**, 473-478
256. Kosk-Kosicka, D. (1990) Comparison of the red blood cell Ca^{2+} -ATPase in ghost membranes and after purification. *Mol Cell Biochem* **99**, 75-81
257. Jensen, A.-M. L., Sørensen, T. L.-M., Olesen, C., Møller, J. V., y Nissen, P. (2006) Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *The EMBO Journal* **25**, 2305-2314
258. Starling, A. P., East, J. M., y Lee, A. G. (1993) Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the calcium-magnesium-ATPase. *Biochemistry* **32**, 1593-1600
259. Cornelius, F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase Activity by Phospholipids and Cholesterol. I. Steady-State Kinetics†. *Biochemistry* **40**, 8842-8851
260. Mangialavori, I. C., Corradi, G., Rinaldi, D. E., de la Fuente, M. C., Adamo, H. P., y Rossi, J. P. F. C. (2012) Autoinhibition mechanism of the plasma membrane calcium pump isoforms 2 and 4 studied through lipid-protein interaction. *Biochemical Journal* **443**, 125-131
261. Filomatori, C. V., y Rega, A. F. (2003) On the Mechanism of Activation of the Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase by ATP and Acidic Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22265-22271
262. Kandasamy, S. K., y Larson, R. G. (2006) Molecular Dynamics Simulations of Model Trans-Membrane Peptides in Lipid Bilayers: A Systematic Investigation of Hydrophobic Mismatch. *Biophysical Journal* **90**, 2326-2343
263. Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., y Engelman, D. M. (2004) Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane

- proteins rather than cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4083-4088
264. Kang, J. X., y Leaf, A. (1994) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9886-9890
 265. Chow, S., y Jondal, M. (1990) Polyunsaturated free fatty acids stimulate an increase in cytosolic Ca^{2+} by mobilizing the inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in T cells through a mechanism independent of phosphoinositide turnover. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 902-907
 266. Fletcher, J. E., Mayerberger, S., Tripolitis, L., Yudkowsky, M., y Rosenberg, H. (1991) Fatty acids markedly lower the threshold for halothane-induced calcium release from the terminal cisternae in human and porcine normal and malignant hyperthermia susceptible skeletal muscle. *Life sciences* **49**, 1651-1657
 267. Teshima, R., Amano, F., Nakamura, R., Tanaka, Y., y Sawada, J.-i. (2007) Effects of polyunsaturated fatty acids on calcium response and degranulation from RBL-2H3 cells. *International immunopharmacology* **7**, 205-210
 268. Tom, C. T., y Martin, B. R. (2012) Fat chance! Getting a grip on a slippery modification. *ACS chemical biology* **8**, 46-57
 269. Fukata, Y., y Fukata, M. (2010) Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 161-175
 270. Swarts, H., Stekhoven, F. S., y De Pont, J. (1990) Binding of unsaturated fatty acids to Na^+ , K^+ -ATPase leading to inhibition and inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1024**, 32-40
 271. Swarts, H. G., Van Uem, T. J., Hoving, S., Fransen, J. A., y De Pont, J. J. H. (1991) Effect of free fatty acids and detergents on H, K-ATPase. The steady-state ATP phosphorylation level and the orientation of the enzyme in membrane preparations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1070**, 283-292
 272. Murakami, S., Muramatsu, M., Araki, H., y Otomo, S. (1994) Structure-activity relationships of unsaturated long chain fatty acids in relation to the inhibition of gastric H^+ , $\text{K}^{(+)}$ -ATPase. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* **85**, 57-66
 273. Rosa, E.-B., y NONAMI, H. (2002) Nor-Harmane (9H-Pyrido [3, 4-b] indole) as outstanding matrix for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of synthetic and bio-polymers. *Environment Control in Biology* **40**, 55-73
 274. Kolb, H. C., Finn, M., y Sharpless, K. B. (2001) Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 2004-2021
 275. Gubbens, J., Ruijter, E., de Fays, L. E., Damen, J. M. A., de Kruijff, B., Slijper, M., Rijkers, D. T., Liskamp, R. M., y de Kroon, A. I. (2009) Photocrosslinking and click chemistry

enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chemistry & biology* **16**, 3-14

- 276. Palsdottir, H., y Hunte, C. (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1666**, 2-18
- 277. Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., y Carafoli, E. (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *European journal of biochemistry* **204**, 939-946